

PCT/JP03/11118

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

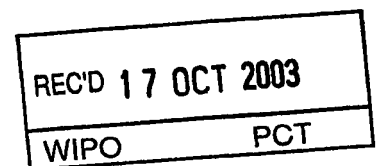
29.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 8月30日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-252446  
[ST. 10/C]: [JP2002-252446]



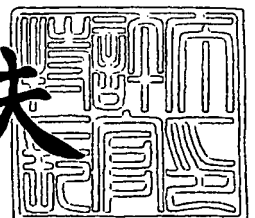
出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ビー・エム・エル  
近藤 直実

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3080538

【書類名】 特許願

【整理番号】 PBM78

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成14年 8月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区上坂町 1 - 3 - 1

    【氏名】 近藤 直実

【発明者】

    【住所又は居所】 岐阜県岐阜市則武中 2 - 1 5 - 1 6   T h e   T O M  
                            3 0 5

    【氏名】 松井 永子

【発明者】

    【住所又は居所】 岐阜県本巣郡北方町春來町 3 - 1 0 3

    【氏名】 金子 英雄

【発明者】

    【住所又は居所】 岐阜県岐阜市靱屋町 1 5 - 1   U - H o u s e ギフ 8 C

    【氏名】 青木 美奈子

【発明者】

    【住所又は居所】 岐阜県岐阜市忠節町 4 - 7 1 - 1   コスモ河村 2 0 2

    【氏名】 長尾 みづほ

【発明者】

    【住所又は居所】 岐阜県羽島市竹鼻町昭和町 3 0 4 5

    【氏名】 笠原 貴美子

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 埼玉県川越市の場 1 3 6 1-1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

**【氏名】** 服部 浩明

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 埼玉県川越市の場 1 3 6 1-1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

**【氏名】** 江頭 徹

**【特許出願人】**

**【識別番号】** 591083336

**【氏名又は名称】** 株式会社ビー・エム・エル

**【特許出願人】**

**【住所又は居所】** 愛知県名古屋市瑞穂区上坂町 1-3-1

**【氏名又は名称】** 近藤 直実

**【代理人】**

**【識別番号】** 100103160

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 志村 光春

**【手数料の表示】**

**【予納台帳番号】** 061920

**【納付金額】** 21,000円

**【提出物件の目録】**

**【物件名】** 明細書 1

**【物件名】** 図面 1

**【物件名】** 要約書 1

**【包括委任状番号】** 9709087

**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アレルギー素因を規定する遺伝子の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 1～9 で示される遺伝子変異からなる群から選ばれる 1～9 種の遺伝子変異を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する、遺伝子変異の検出方法。

1. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖蛋白質の 313 番目のアルギニンをコードする部位の変異。

2. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖蛋白質の 604 番目のアラニンをコードする部位の変異。

3. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖蛋白質の 619 番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異。

4. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖蛋白質の 720 番目のヒスチジンをコードする部位の変異。

5. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖蛋白質の 361 番目のアルギニンをコードする部位の変異。

6. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖蛋白質の 365 番目のメチオニンをコードする部位の変異。

7. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖蛋白質の 378 番目のグリシンをコードする部位の変異。

8. インターロイキン 18 レセプター  $\alpha$  鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 18 レセプター  $\alpha$  鎖蛋白質の 317 番目のアラニンが欠失する変異。

9. インターフェロン $\gamma$ レセプター1鎖遺伝子によってコードされるインターフェロン $\gamma$ レセプター1鎖蛋白質の467番目のロイシンをコードする部位の変異。

【請求項2】請求項1記載の遺伝子変異の検出方法において、

1. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の313番目のアルギニンをコードする部位の変異、が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子の937番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の313番目のアルギニンのグリシンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項3】請求項1または2記載の遺伝子変異の検出方法において、

2. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の604番目のアラニンをコードする部位の変異、が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子の1811番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の604番目のアラニンのバリンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項4】請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、

3. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子の1856～1946番目の塩基の欠失である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項5】請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、

4. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の720番目のヒスチジンをコードする部位の変異が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子の2159番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の720番目のヒスチジンのアルギニンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項6】請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において

、

5. インターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖蛋白質の361番目のアルギニンをコードする部位の変異が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖遺伝子の1081番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の361番目のアルギニンのトリプトファンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項7】請求項1～6のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において

、

6. インターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖蛋白質の365番目のメチオニンをコードする部位の変異が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖遺伝子の1094番目の塩基であるチミンがシトシンに置換していることによる、上記の365番目のメチオニンのスレオニンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項8】請求項1～7のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において

、

7. インターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖蛋白質の378番目のグリシンをコードする部位の変異が、

インターロイキン12レセプター $\beta$ 1鎖遺伝子の1132番目の塩基であるグアニンがシトシンに置換していることによる、上記の378番目のグリシンのアルギニンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項9】請求項1～8のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において

、

8. インターロイキン18レセプター $\alpha$ 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン18レセプター $\alpha$ 鎖蛋白質の317番目のアラニンが欠失する変異が

、  
インターロイキン18レセプター $\alpha$ 鎖遺伝子の950～952番目の塩基の欠失である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項10】請求項1～9のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、

9. インターフェロン $\gamma$ レセプター1鎖遺伝子によってコードされるインターフェロン $\gamma$ レセプター1鎖蛋白質の467番目のロイシンをコードする部位の変異が、

インターフェロン $\gamma$ レセプター1鎖遺伝子の1400番目の塩基であるチミンがシトシンへの置換することによる、上記の467番目のロイシンのプロリンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項11】請求項1～10のいずれかに記載の検出方法が、インベーター・アッセイ法を行って遺伝子変異を検出する方法である、遺伝子変異の検出方法。

【請求項12】下記1～9で示される遺伝子変異からなる群から選ばれる1～9種の遺伝子変異を検出するための要素が備わっている、遺伝子変異検出用キット。

1. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の313番目のアルギニンをコードする部位の変異。

2. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の604番目のアラニンをコードする部位の変異。

3. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異。

4. インターロイキン12レセプター $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるイ

インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  2 鎖蛋白質の 720 番目のヒスチジンをコードする部位の変異。

5. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖蛋白質の 361 番目のアルギニンをコードする部位の変異。

6. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖蛋白質の 365 番目のメチオニンをコードする部位の変異。

7. インターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 12 レセプター  $\beta$  1 鎖蛋白質の 378 番目のグリシンをコードする部位の変異。

8. インターロイキン 18 レセプター  $\alpha$  鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン 18 レセプター  $\alpha$  鎖蛋白質の 317 番目のアラニンが欠失する変異。

9. インターフェロン  $\gamma$  レセプター 1 鎖遺伝子によってコードされるインターフェロン  $\gamma$  レセプター 1 鎖蛋白質の 467 番目のロイシンをコードする部位の変異。

【請求項 13】 請求項 12 のキットが、インベダー・アッセイ法を行って、遺伝子変異を検出するキットである、遺伝子変異検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトの遺伝子変異の検出方法に関し、より具体的には、ヒトのアレルギー素因を検出するための指標となり得る遺伝子変異の検出方法に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】

アレルギーは、アレルゲンの侵入により応答して生ずる、生体にとっては不利な免疫反応の総称であり、その機序の違いにより、I 型から V 型までの、大きく 5 つに分類される。また、アトピー（異型の疾患の意味）とは、抗原と抗体に



よる免疫反応のうち、IgE抗体が関与する I 型の反応を示す遺伝的な素質を意味する用語である。そして、このアトピーがかかわって発症する疾患が、アトピー性疾患である。アレルギー疾患の多くは、このアトピー性疾患であることが知られている。かかるアレルギー（アトピー）性疾患は、遺伝的な素因と、環境要因（アレルゲンの存在）によって発症するといわれている。

#### 【0003】

このように、アレルギー（アトピー）性疾患の発症要素として、アレルゲンは最も本質的なものであり、例えば、アトピー性喘息のアレルゲンは、ハウスダスト、ダニ、カンジダ等である場合が多く、アレルギー性鼻炎では、スギやブタクサの花粉である場合が多い。また、食物性アレルゲンとしては、鶏卵、ミルク、大豆等が挙げられる。

#### 【0004】

アレルギー（アトピー）性疾患の発症には、まず、生体に、アレルギー（アトピー）の素因が存在することが前提となり、その生体が、アレルゲンと接触することにより、様々な要因によって、アレルギー（アトピー）性疾患が発症する。例えば、上記の I 型アレルギーは、即時型アレルギーとして知られており、アレルゲンが、生体内に侵入することにより、IgE抗体が産生される。このIgE抗体はFcεレセプターを介してマスト細胞や好塩基球上に結合する。ここにアレルゲンが結合することにより、2分子のIgE抗体が架橋し、その結果、細胞内顆粒に貯蔵されているヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、アリルサルファターゼ、NCF (neutrophil chmotactic factor)、ECP (eosinophil cationic protein) などが脱顆粒により放出される。さらに、アラキドン酸から新たに産生されるロイコトリエンB<sub>4</sub>、C<sub>4</sub>、D<sub>4</sub>、プロスタグランジンE<sub>2</sub>、F<sub>2</sub>α、I<sub>2</sub>、トロンボキサンA<sub>2</sub>や、血小板活性化因子(PAF)などの化学伝達物質が放出される。これら放出されたヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質は、好酸球、好中球、リンパ球、単球、マクロファージなどの炎症細胞を刺激し、平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、粘液分泌亢進などを引き起こし、アレルギーが発症する。

#### 【0005】

このように、アレルギー（アトピー）性疾患の発症に際しては、まず、アレル

ギー（アトピー）の素因が必要であり、この素因を有する生体が、アレルゲンに感作されて免疫アレルギー反応が惹起され、さらに種々の要因が加わり、はじめてアレルギー（アトピー）性疾患が発症し、さらに増悪因子によっても影響されるものと考えられている。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上述したように、IgEはアレルギーを規定する、最も、基本的で、かつ、重要な蛋白質である。

本発明は、このIgEの産生に関連する遺伝子とアレルギー（アトピー）の素因とを関連づける要素を見い出して、これを利用した、アレルギー（アトピー）の素因の解析手段を提供することで、アレルギー（アトピー）性疾患の発症の予防や、アレルギー（アトピー）性疾患の治療に寄与する途を提供することにある。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

IgE産生はT細胞（TH2）より分泌されるインターロイキン4（IL-4）等が、B細胞を刺激することにより起こる。このように、IgEの産生は、IL-4を中心とする情報伝達により誘導され、活性化される。

#### 【0008】

一方、このIL-4によるB細胞からのIgE産生は、T細胞（TH1）より分泌されるインターフェロン $\gamma$ （INF- $\gamma$ ）を中心とする情報伝達により制御され、INF- $\gamma$ 産生は、その情報伝達の上流で、さらにインターロイキン12（IL-12）やインターロイキン18（IL-18）等の、サイトカインによるT細胞への刺激により、その産生が誘導される。

#### 【0009】

このように、アレルギー反応の主役であるIgEの産生は、IL-4による産生誘導と、INF- $\gamma$ による産生抑制とのバランスによってコントロールされており、このバランスが崩れることによって、IgEの産生のバランスも崩れることとなる。IgE産生促進系のシステムは、IL-4が、そのレセプターであるIL-4レセプター（IL-4R）に結合することによりIgE産生が促されるシステムであり、IgE産生抑制系の

システムは、IL-12 あるいはIL-18が、それぞれのレセプターであるIL-12レセプター (IL-12R) あるいはIL-18レセプター (IL-18R) に結合することによりINF- $\gamma$ が分泌され、IgE産生が抑制されるシステムである。

#### 【0010】

本発明者らは、このIgEの産生システムに関連する遺伝子について着目することで、目的とするアレルギー（アトピー）の素因を遺伝子レベルで特定できるのではないかと考えた。

#### 【0011】

本発明者の一人は、アレルギー疾患においては、家族的、あるいは、遺伝的集積があると考えられていることから、患者のIgE産生量を測定し、その結果、両親のいずれかに血清IgE値が高値であるほど、発端者のIgEが高値である結果を得た（近藤直実、他、アトピー性皮膚炎とIL-12レセプター遺伝子変異、臨床免疫36:535-540, 2001）。また、患者末梢血単核球（PBMCs）を分離し、マイトゲンあるいは抗原刺激により産生される、培養上清中のINF- $\gamma$ とIL-4量を測定したところ、IgE高値の患者においてIgE値と産生IL-4量は正相関を示すよりは、むしろ、INF- $\gamma$ と負の相関を示すことが明らかになった（Teramoto T. et al., Clin Exp Allergy, 28:74-82, 1998）。さらに、卵に過敏性のある患者では、オブアルブミン刺激後の、培養上清中のIL-4量と血清IgE値に、有意な（ $p<0.01$ ）正相関が認められ、INF- $\gamma$ 量と血清IgE値においては、有意な（ $p<0.05$ ）逆相関が認められた（Kuwabara N, et al., J Investig Allergol Clin Immunol 5:198-204, 1995）。また、IL-4とポークウィードマイトゲンで刺激した、PBMCsのIgE産生が、リコンビナントINF- $\gamma$ により抑制される（Kuwabara N, et al., J Investig Allergol Clin Immunol 5:198-204, 1995）ことから、INF- $\gamma$ が、IL-4により誘導されるIgE産生を抑制していることと、INF- $\gamma$ の産生が低下していると、IgE産生が亢進することが示唆された。さらに、INF- $\gamma$ のmRNAを定量したところ、INF- $\gamma$ の産生量は、INF- $\gamma$ のmRNA量と強い正相関（ $r=0.947$ ,  $n=8$ ）を示すことから、上記INF- $\gamma$ の産生低下は、INF- $\gamma$ のmRNA発現低下によることが明らかになった（Teramoto T. et al., Clin Exp Allergy, 28:74-82, 1998）。

#### 【0012】

このような研究成果を基に、アレルギーのIgE産生過剰におけるINF- $\gamma$ 産生不全と考えられる病態に関して、さらに情報伝達の上位でINF- $\gamma$ の産生誘導するIL-12とIL-18について検討した。IL-12は、分子サイズ75kDで、35kD (p35) と40kD (p40) のサブユニットとからなるヘテロダイマーの蛋白質である。IL-12レセプター (IL-12R) は、 $\beta$ 1鎖と $\beta$ 2鎖からなり、 $\beta$ 2鎖は細胞内ドメインに3ヶ所のチロシン残基を有する。IL-12Rは、IL-12のシグナルカスケードの初発ステップである。患者由来PBMCsを、IL-12、あるいは、IL-18で刺激した際の培養上清中のINF- $\gamma$ 産生量を測定した結果、両者それぞれの刺激で産生されるINF- $\gamma$ 産生量は、正相関を示した。しかしながら、両者の刺激によるINF- $\gamma$ 産生に乖離する症例が認められた。

#### 【0013】

このような結果は、PBMCsを、IL-12刺激、フィトヘマアグラチニン (PHA) 刺激した際のINF- $\gamma$ 産生量にも同様に認められた。これらのINF- $\gamma$ 産生量に乖離が認められた症例について、それぞれのレセプターを含む情報伝達系の異常を検索した。

#### 【0014】

このような結果に基づき、遺伝子解析を行った結果、アレルギー (アトピー) の素因に関連する、複数の遺伝子変異が認められた (後述する)。

これらの遺伝子変異は、IgEの産生バランスに深く関わっており、これらの遺伝子変異についての解析を行うことにより、被験者のアレルギー (アトピー) の素因を検出することが可能であることを、本発明者は見出し、本発明を完成した。

#### 【0015】

すなわち、本発明は、後述する1～9で示される遺伝子変異からなる群から選ばれる1～9種の遺伝子変異を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する、遺伝子変異の検出方法 (以下、本遺伝子検出方法ともいう) を提供する発明である。

#### 【0016】

なお、本明細書におけるアミノ酸の表記方法は、三文字法及び一文字法による

。念のために、かかる表記内容をここに記載する。

『アラニン [Ala (三文字法、以下同様)、A (一文字法、以下同様)]

バリン [Val、V]、ロイシン [Leu、L]、イソロイシン [Ile、I]、プロリン [Pro、P]、フェニルアラニン [Phe、F]、トリプトファン [Trp、W]、メチオニン [Met、M]、グリシン [Gly、G]、セリン [Ser S]、スレオニン [Thr、T]、システイン [Cys、C]、グルタミン [Gln、Q]、アスパラギン [Asn、N]、チロシン [Tyr、Y]、リジン [Lys、K]、アルギニン [Arg、R]、ヒスチジン [His、H]、アスパラギン酸 [Asp、D]、グルタミン酸 [Glu、E]』

#### 【0017】

また、本明細書中の表記で、例えば、「A100V」とは、「本来のアミノ酸配列における100番目のアラニンが、バリンに置換されている変異」を示すものとする。

#### 【0018】

また、後述する1～9で表される遺伝子変異を特定する基となる、野生型の遺伝子配列における配列表記は、特に断らない限り、全て、cDNAの塩基配列番号である。よって、1～9の遺伝子変異は、全て、少なくともcDNAにおいて認められる変異であるが、かかるcDNAの変異に対応するゲノムDNAにおける変異や、mRNAにおける変異、に基づくアレルギー素因の検出にかかわる遺伝子変異の検出方法も、本遺伝子変異検出方法の技術的範囲に包含されるものである。

#### 【0019】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

上述したように、本発明は、アレルギー（アトピー）の素因に関連する遺伝子である、インターロイキン12レセプター (IL-12R)  $\beta$  2鎖および $\beta$  1鎖遺伝子と、インターロイキン18レセプター (IL-18R)  $\alpha$  鎖遺伝子と、インターフェロン $\gamma$ レセプター (INF $\gamma$ R) 1鎖遺伝子における遺伝子変異を検出することで、アレルギー（アトピー）の素因を検出する、遺伝子変異の検出方法である。

## 【0020】

IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子と、これがコードする IL-12R $\beta$  2 鎖蛋白質については、すでに解析がなされている (Presky D, et al., Proc Natl Acad Sci, 93:14002-14007, 1996)。この IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 1 に示した (Gene Bank Accession Number:U64198)。IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子と、これがコードする IL-12R $\beta$  1 鎖蛋白質についても解析がなされている (Chua A, et al., J Immun, 153:128-136, 1994)。この IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 2 に示した (Gene Bank Accession Number:U03187)。また、INF $\gamma$  R1 鎖遺伝子と、これがコードする INF $\gamma$  R1 鎖蛋白質については、すでに解析がなされている (Aguet M, Cell, 55:273-280, 1988)。この INF $\gamma$  R1 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 3 に示した (Gene Bank Accession Number:J03143)。また、IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子と、これがコードする IL-18R $\alpha$  鎖蛋白質については、すでに解析がなされている (Parnet P, J Biol Chem, 271:3967-3970, 1996)。この IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子 cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 4 に示した (Gene Bank Accession Number:U43672)。

## 【0021】

特定の遺伝子の変異と、これらの変異遺伝子がコードして産生される変異蛋白質により惹起されると考えられる現象、すなわち、種々のアレルギー性疾患 (例えば、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー等) との関係をも具体的に解析することにより、本遺伝子検出方法において利用し得る、IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子と、IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子と、IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子と、INF $\gamma$  R1 鎖遺伝子における遺伝子変異を見い出すことができる。すなわち、アレルギー (アトピー) 性疾患と健常人等の組み合わせにおいて、IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子と、IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子と、IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子と、INF $\gamma$  R1 鎖遺伝子の変異部位と変異頻度、あるいは、その変異により生ずる蛋白質の機能を解析することにより、所望する遺伝子変異を見出すことができる。かかる作業の実際については、後述する実施例において、具体的に記載する。

## 【0022】

なお、本発明において、「遺伝子変異」とは、ヒト染色体における遺伝子の変異を意味するものであり、遺伝子の塩基配列が野生型（正常遺伝子の塩基配列）と異なる場合のことを意味するものである。また、遺伝子が、その塩基配列において、個体毎に異なる特異的な部位を保有している場合には、一般的にこれは、「遺伝子多型」として表現され得るが、本発明においては、この「遺伝子多型」も「遺伝子変異」の範疇に含まれるものとする。また、ゲノムDNAにおいては認められず、ゲノムDNAから、mRNA前駆体を経て、mRNAになる過程（主に、mRNA前駆体のスプライシングの過程）で生ずる変異（この変異は、主にcDNAにおける変異として特定され得る）も、「遺伝子変異」の範疇に含まれることとする。「遺伝子変異」は、その遺伝子の変異頻度、そのmRNAの発現量、蛋白発現量、あるいは蛋白の機能等の多角的な解析により、同定される。

#### 【0023】

本発明者は、前述したように、現在までに、IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子と、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子と、IL-18R $\alpha$ 鎖遺伝子と、INF $\gamma$ R1鎖遺伝子において見い出され、アレルギー素因と関連が認められる遺伝子変異として、

#### 【0024】

1. IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$ 2鎖蛋白質の313番目のアルギニンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子の937番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の313番目のアルギニンのグリシンへの置換等）、

#### 【0025】

2. IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$ 2鎖蛋白質の604番目のアラニンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子の1811番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の604番目のアラニンのバリンへの置換等）、

#### 【0026】

3. IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$ 2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異（例えば、IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子の1856～1946番目の塩基の欠失変異等）、

## 【0027】

4. IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R $\beta$  2 鎖蛋白質の 720 番目のヒスチジンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子の 2159 番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の 720 番目のヒスチジンのアルギニンへの置換等）、

## 【0028】

5. IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R $\beta$  1 鎖蛋白質の 361 番目のアルギニンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子の 1081 番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の 361 番目のアルギニンのトリプトファンへの置換等）、

## 【0029】

6. IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R $\beta$  1 鎖蛋白質の 365 番目のメチオニンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子の 1094 番目の塩基であるチミンがシトシンに置換していることによる、上記の 365 番目のメチオニンのスレオニンへの置換等）、

## 【0030】

7. IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R $\beta$  1 鎖蛋白質の 378 番目のグリシンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子の 1132 番目の塩基であるグアニンがシトシンに置換していることによる、上記の 378 番目のグリシンのアルギニンへの置換等）、

## 【0031】

8. IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子によってコードされる IL-18R $\alpha$  鎖蛋白質の 317 番目のアラニンが欠失する変異（IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子の 950～952 番目の塩基の欠失変異）、

## 【0032】

9. INF- $\gamma$  R 1 鎖遺伝子によってコードされる インターフェロン $\gamma$  R 1 鎖蛋白質の 467 番目のロイシンをコードする部位の変異（例えば、INF- $\gamma$  R 1 鎖遺伝子の 1400 番目の塩基であるチミンがシトシンへの置換することによる、上記の 467 番目のロイシンのプロリンへの置換等）、が挙げられる。



## 【0033】

遺伝子変異部位における変異の検出方法としては、通常公知の方法、例えば、サザンブロット法を用いたRFLP法や、PCR-RFLP法、HET(heteroduplex analysis)法、DGGE法(denaturing gradient gel electrophoresis)法、DS(direct sequence)法、CCM(chemical cleavage mismatch)法、CDI(carbodiimid modification)法、さらにはPCR法を用いた一本鎖DNA高次構造多型解析法〔PCR-SSCP(single-stranded conformation polymorphism)法、以下、本明細書においてはSSCP法という〕、PCR/GC-clamp法、インベダー・アッセイ法〔Third Wave Technologies 社(米国)〕等を用いることができる〔例えば、バイオマニュアルシリーズ1, 遺伝子工学の基礎技術, 山本 雅編, 羊土社(1993)等を参照のこと、特に、PCR/GC-clamp法については、Myers, R.M., Sheffield, V., and Cox, D.R. (1988) in Genomic Analysis: A Practical Approach. K. Davies, ed. IRL Press Limited, Oxford, pp. 95-139等を参照のこと〕が、簡便かつ正確に遺伝子変異を特定し得るという点において、インベダー・アッセイ法を選択することが好ましい。

## 【0034】

第1図は、このインベダー・アッセイ法のあらましを略図化した図面である。

第1図において、鋳型ヌクレオチド鎖11〔野生型遺伝子(ゲノムDNAの塩基配列であっても、cDNAの塩基配列であってもよい)〕に対して、まず、第1のヌクレオチド鎖12をハイブリダイズさせる。

## 【0035】

第1のヌクレオチド鎖12は、鋳型ヌクレオチド鎖11における、変異検出対象塩基〔本図では、野生型がT(チミン)〕に相補的な塩基〔本図では、A(アデニン)〕が3'末端に位置する、鋳型ヌクレオチド鎖11に対して相補的なヌクレオチド鎖である(なお、この例では、第1のヌクレオチド鎖12の3'末端の塩基は、変異検出対象塩基に対して相補的であるが、たとえ相補的塩基ではなくても、その塩基が、変異検出対象塩基と第2のヌクレオチド鎖の会合反応に干渉することにより、部分的三重鎖構造が形成され得る)。

## 【0036】

次いで、この鋳型ヌクレオチド鎖11と第1のヌクレオチド鎖12との部分的2本鎖に対して、さらに、第2のヌクレオチド鎖13をハイブリダイズさせる。

第2のヌクレオチド鎖13は、鋳型ヌクレオチド鎖11に対して相補的な「相補的部分」131が、3'側にあり、これと連続して、検出要素が設けられた、鋳型ヌクレオチド鎖に対して非相補的な「検出用部分」132が、5'側にある、複合的ヌクレオチド鎖であり、「相補的部分」131の最も5'側の塩基は、変異検出対象塩基(T)に対して相補的な塩基(A)となっている。

## 【0037】

この第2のハイブリダイズ反応によって、鋳型ヌクレオチド鎖11の変異検出対象塩基部分(T)は、第1のヌクレオチド鎖12の3'末端塩基と、第2のヌクレオチド鎖の「相補的部分」131の最も5'側の塩基(A)との、部分的三重鎖構造が形成されることとなる。

## 【0038】

次いで、この部分的三重鎖構造を、その3'側で特異的に切断する活性を有するヌクレアーゼ14を作用させて、このヌクレアーゼにより切断された、第2のヌクレオチド鎖13の検出用部分132'〔3'末端が、変異検出対象塩基(T)に対して相補的な塩基(A)となっている〕を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖11が、野生型であることを検出することができる。

## 【0039】

本図においては、5'末端近傍に蛍光色素151とその3'側の近傍に蛍光消光物質(クエンチャー)152を標識した、ヘアピン型プローブ(ヌクレオチド鎖)15を、上記のハイブリダイズ系と共存させることにより、上記の野生型の検出が可能である。

## 【0040】

ヘアピン型プローブ15の3'側の一本鎖部分は、第2のヌクレオチド鎖13の検出用部分132に対して相補的に設計されており、かつ、かかる一本鎖部分の最も5'側の塩基に隣合うさらに5'側の一塩基は、変異検出対象塩基(T)となっている。そして、検出用部分132'が、ヘアピン型プローブ15の一本

鎖部分とハイブリダイズすると、検出用部分 132' の 3' 末端の塩基 (A) が、ヘアピン型プローブ 15 の二本鎖部分の先端において、再び、部分的三重鎖構造を形成する。これに対し、再度、ヌクレアーゼ 14 が作用して、ヘアピン型プローブ 15 における、蛍光色素 151 と蛍光消光物質 152 の間が切断され、蛍光色素 151 が遊離し、蛍光消光物質 152 による蛍光消光作用から開放されて、本来の蛍光が検出可能な状態となる。この蛍光を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖 11 が、変異検出対象塩基において変異が認められない野生型遺伝子であることを検出することができる。

#### 【0041】

これに対して、鋳型ヌクレオチド 11 の変異検出対象塩基が、野生型の塩基 (T) ではなく、例えば、G (グアニン) である SNP 塩基であり、これをポジティブに検出する場合には、第 1 のヌクレオチド鎖 12 と第 2 のヌクレオチド鎖 13 における、相補的塩基を、上記の A から、G に相補的な C (シトシン) として、さらに、ヘアピン型プローブ 15 における蛍光色素 151 と蛍光消光物質 152 を、上記の系とは異なる蛍光を発色する蛍光色素と、これに対する蛍光消光物質とすることにより、鋳型ヌクレオチド鎖 11 における SNPs を、異なる蛍光色素の蛍光によって検出することが可能である。

#### 【0042】

また、鋳型ヌクレオチド 11 が、野生型塩基と変異型塩基を有するものが、混在する場合 (ヘテロ型) は、上記の 2 種類の蛍光の混合型蛍光として、ポジティブに検出することも可能である。

#### 【0043】

なお、ここには、ヘアピン型プローブを用いた検出システムを例示したが、これ以外にも、例えば、検出用部分 132 に、直接、蛍光標識やアイソトープ標識を行って、直接、検出用部分を検出することにより、遺伝子変異を検出することも可能である。さらに、ここでは、遺伝子変異を有する場合も、そうでない場合も、ポジティブに検出する例を示したが、いずれかの場合においては、蛍光等の標識が検出されない、ネガティブな検出を行うことも可能である。

#### 【0044】

上述したインベーター・アッセイ法は、技術的には、反応の進行に伴い、部分的三重鎖構造を特異的に切断するヌクレアーゼが、第2のヌクレオチド鎖の「検出用部分」を切り出す段階において（ヘアピン型プローブを用いる場合には、標識された蛍光物質を蛍光消光物質と切り離す段階においても）、連続的に働くため、蛍光等の、インベーター・アッセイ法において用いる標識が増感される、極めて鋭敏な液相反応である。

#### 【0045】

PCR/GC-clamp 法は、DGGE法（DNA変性剤の直線的な濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルにおける、塩基置換を含む二本鎖DNA断片と含まない二本鎖DNA断片の、DNAを変性させるべきDNA変性剤濃度の相違に基づく移動度の差異を利用して、DNAの塩基置換を検出する方法）の変法であり、DGGE法における、「複数の塩基置換がある場合に、ポリアクリルアミドゲルにおいて、最後に融解するドメインの塩基置換を検出することができない」という欠点を、GC含量の高い領域（GC-clamp）を、塩基置換の検出対象であるDNA断片につなげることにより克服した方法である〔Sheffield, V.C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:232-236等を参照のこと〕。

#### 【0046】

よって、PCR/GC-clamp 法の基本的操作等は、DGGE法に準ずるが、塩基置換検出の対象となるDNA断片に、GC-clamp を付加する工程が必要となる。

#### 【0047】

本遺伝子検出方法における、IL-12R $\beta$  2 鎖遺伝子と、IL-12R $\beta$  1 鎖遺伝子と、IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子と、INF $\gamma$  R1 鎖遺伝子の変異の検出の対象となるDNAの出所は、特に限定されるべきものではなく、被験者の体細胞であれば、特に限定されない。例えば、末梢血や白血球等の血液検体を、本発明において好適に選択することができる。

#### 【0048】

すなわち、被験者の検体細胞（分離後、培養したものを用いることもできる）から、公知の方法を用いてゲノムDNAを抽出し、このゲノムDNAにおいて、

特定の遺伝子部位における遺伝子変異（具体的には、特定の遺伝子部位における塩基の置換、欠失、挿入等）を検出することができる。また、被験者の検体細胞（分離後、培養したものを用いることもできる）から、公知の方法を用いて、mRNAを抽出し、このmRNAを鋳型として得られるcDNAにおける変異を検出することも可能である。

#### 【0049】

そして、この検出作業の結果、上述した特定の遺伝子部位に変異が認められた場合、この遺伝子部位の変化と、アレルギー（アトピー）の素因と関連付けて、被験者が発症する蓋然性の高いアレルギー（アトピー）疾患の種類や、現に発症しているアレルギー（アトピー）疾患の原因を特定することができる。

#### 【0050】

本遺伝子検出方法を行う態様は、特に限定されず、選択する遺伝子変異の検出方法に応じて適宜選択することができる。典型的には、本遺伝子検出方法を行うための要素が備わっている、遺伝子変異検出用キットを用いて行うことが可能である。具体的には、例えば、ウエルが設けられているマイクロプレートの個々のウエルに、本遺伝子検出方法を行うために必要な材料や試薬を組み合わせ、遺伝子変異の検出反応を行い、かかる検出反応により、所望する遺伝子変異を検出することができる。また、マイクロプレートに代えて、いわゆるマイクロアレイを用いて、遺伝子変異の検出を、さらに集約的に行うことも可能である。このように、この遺伝子変異検出用キットは、マイクロプレートやマイクロアレイ等の遺伝子検出を行う器具、試薬、希釈液等を、必要に応じて組み合わせ、その構成要素とすることができる。

#### 【0051】

本遺伝子検出方法を行うことによって、例えば、特定の遺伝子部位に変異が認められる場合には、被験者において、アレルギー（アトピー）の素因が認められ、現時点で、被験者に異常がなくても、アレルギー（アトピー）疾患を発症するリスクが高いことを明らかにすることができる。このような場合、環境因子対策（例えば、ハウスダスト対策や、非アレルギー食物の摂取等）を行うことによって、アレルギー（アトピー）疾患の発症を予防することが可能である。

## 【0052】

また、例えば、既に、アレルギー（アトピー）疾患を発症している被験者に対して、本遺伝子検出方法を行うことにより、その疾患に対する原因遺伝子異常を、高い確度で推定することが可能である。このような場合、特定された遺伝子異常に対応した治療方法を選択することにより、より効果的なアレルギー（アトピー）疾患の治療を行うことができる。

## 【0053】

さらに、原因遺伝子異常がアレルギー（アトピー）疾患を惹起するメカニズムを明らかにすることにより、かかるメカニズムに対応した、アレルギー（アトピー）の治療薬の開発の途を提供することも可能である。

## 【0054】

## 【実施例】

以下、実施例により、本発明を、さらに具体的に説明するが、これにより、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

## 【0055】

## [遺伝子の解析法]

末梢血単核球の分離および培養

末梢血単核球は静脈より血液を5 mlヘパリン採血し、ヘパリン血をFicoll（シグマ社製）に重層し、比重遠心により分離した。分離した単核球は10%ウシ胎児血清、2 mmol/l L-グルタミン、100 U/mlペニシリン、および100 U/mlストレプトマイシン含有RPMI1640培地にて細胞数 $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度にして、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。単核球の刺激は、10  $\mu$ g/mlフィトヘマアグラチニン（PHA、Gibco BRL社製）、あるいは5 IU/ml IL-12（R&D社製）、あるいは400 IU/ml IL-18（MLB社製）を培地に添加し、行なった。

## 【0056】

サイトカインの定量

刺激した単核球は、24時間培養後、回収し、遠心により細胞画分を取り除き、培養上清を得た。得られた培養上清中のINF- $\gamma$ 量は、ELISAキット（大塚アッセイ社製）を用いて測定した。

## 【0057】

RNA抽出およびRT-PCR

RNAは、24時間PHA刺激した培養単核球を回収し、Isogenキット（日本ジーン社製）を用いて抽出し、さらに、これを用いて、常法により、cDNAの合成を行った。IL-12R $\beta$ 1鎖、IL-12R $\beta$ 2鎖、IL-18R $\alpha$ 鎖、およびINF- $\gamma$ R1鎖の、それぞれのcDNAのRT-PCR増幅は、それぞれ、特異的なプライマーセット（下記第1表）を用いて行なった。PCR反応は94℃で1分間、54℃で1分間、72℃で1分間のサイクルで、40サイクル行なった。

## 【0058】

第 1 表

配列	レセプター	プライマーシーケンス
1	IL-12R $\beta$ 1鎖	5'-CTCCTCGAACCAATTTGGTC-3'
2	IL-12R $\beta$ 1鎖	5'-CTGCACTTCGATGCTGAAGC-3'
3	IL-12R $\beta$ 2鎖	5'-CGGAGTTCTATACCAGAGTTG-3'
4	IL-12R $\beta$ 2鎖	5'-ACATCTAACATCCCAGTAGGC-3'
5	IL-12R $\beta$ 2鎖	5'-GATGACAGCTCTGACAGCTG-3'
6	IL-12R $\beta$ 2鎖	5'-GGCCTGATGACCTTGGATT-3'
7	IL-18R $\alpha$ 鎖	5'-CTGCTCTGCTTTGCTGAATG-3'
8	IL-18R $\alpha$ 鎖	5'-TCCTCTTGTGAAGACGTGGC-3'

9	INF- $\gamma$ R1鎖	5'-CGTCATACCAGCCATTTTCC-3'	
10	INF- $\gamma$ R1鎖	5'-TTGGTGCAACTTAGCTGATC-3'	

配列 1～10 は、それぞれ、後述する配列表の配列番号 5～14 に対応する。

#### 【0059】

##### 塩基配列の決定

それぞれのPCR産物はT-vector (Novagen社製) に組み込み、組み込まれたベクターを大腸菌 (JM109株) に導入し、導入大腸菌株をクローニングした。クローニングした大腸菌よりプラスミドを抽出し、シーケンス等により、フラグメントの塩基配列を決定した。

#### 【0060】

##### [臨床における解析]

アレルギー (アトピー) 疾患の患者 75 名 (以下、アレルギー (アトピー) 疾患の患者の抽出集団を「アレルギー群」ともいう) について、非アレルギー (アトピー) 疾患の健常者 62 名 (以下、非アレルギー (アトピー) 疾患の健常者の抽出集団を「非アレルギー群」ともいう) を対照として、末梢血単核球を分離し、IL-12、あるいはPHA刺激したときのINF- $\gamma$  産生量を測定した。

#### 【0061】

PHA刺激によるINF- $\gamma$  産生量は、非アレルギー群において116～10338 pg/ml (平均2886 pg/ml) であるのに対し、アレルギー群においては、46～10000 pg/ml (平均1324 pg/ml) と低下していた。また、IL-12刺激におけるINF- $\gamma$  産生量は、非アレルギー群が、55～10000 pg/ml (平均971 pg/ml)、アレルギー群が、検出限界以下から1130 pg/ml (平均145 pg/ml) と有意に低下が認められた。アレルギー (アトピー) 疾患の患者 75 名のうち、24 名は、IL-12刺激によるINF- $\gamma$  産生量が、検出限界以下であった。このINF- $\gamma$  産生量が、検出限界以下を呈したアレルギー (アトピー) 疾患例について、IL-12R $\beta$  2鎖の遺伝子を検索した。その結果、下記の遺伝子変異が特定された。

#### 【0062】



遺伝子変異 1 (第 2 図参照)

第 2 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子の937番目の塩基Aが、Gに置換しており、この塩基置換により、IL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の313番目のアミノ酸Arg (AGA) が、Gly (GGA) に置換する変異であった (R313G変異)。

## 【0063】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の313番目のArgをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

## 【0064】

遺伝子変異 2 (第 3 図参照)

第 3 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子の1811番目の塩基Cが、Tに置換しており、この塩基置換により、IL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の604番目のアミノ酸Ala (GCT) が、Val (GTT) に置換する変異であった (A604V変異)。

## 【0065】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の604番目のAlaをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

## 【0066】

遺伝子変異 3 (第 4 図参照)

第 4 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子の1856番目から1946番目の91塩基が欠失しており、フレームシフトにより欠失部位下流45番目のアミノ酸が、ストップコドン (TAG) に置換しているものであった。この91塩基の欠失により、アミノ酸623個の異常なIL-12R $\beta$  2鎖蛋白質が産生されることが予想される (1856del91変異)。

## 【0067】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子によってコードされる

IL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

#### 【0068】

##### 遺伝子変異4（第5図参照）

第5図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子の2159番目の塩基Aが、Gに置換しており、この塩基置換によりIL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の720番目のアミノ酸His (CAT) がArg (CGT) に置換する変異であった (H720R変異)。

#### 【0069】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$  2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$  2鎖蛋白質の720番目のHisをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

#### 【0070】

これらの遺伝子変異1～4が認められた被験者より、上述のごとく末梢血単核球を分離し、IL-4、INF- $\gamma$ 、およびIL-12存在下にて細胞を培養し、培養上清中に分泌されたIgE量を測定した。その結果、このような変異が認められないアレルギー（アトピー）疾患の患者に由来する単核球においては、IL-4により惹起されるIgE産生が、INF- $\gamma$ 、あるいはIL-12共存下において抑制されたのに対し、これらの変異を有するアレルギー（アトピー）疾患の患者に由来する単核球においては、INF- $\gamma$  共存下において、IgE産生が抑制されたが、IL-12共存下においてはその抑制が認められなかった（第6図）。このことは、IL-12を介したINF- $\gamma$  産生系の情報伝達における過程において異常が生じ、INF- $\gamma$  が産生されていないことを意味し、IL-12Rに機能的異常が存在することを示している。

#### 【0071】

以上の結果より、遺伝子変異1～4により、IL-12Rに異常が生じ、その結果、INF- $\gamma$  の産生が出来ず、INF- $\gamma$  によるIgE産生が、十分に抑制されないことが示された。また、遺伝子変異1～4は、アレルギー（アトピー）疾患の症例において、有意(P=0.0179)に高い頻度で出現していることが示された。

#### 【0072】

さらに、IL-12R $\beta$ 2鎖遺伝子における変異1、3、4は、IL-12刺激によるINF- $\gamma$ 産生量が、検出限界以下であったアレルギー（アトピー）疾患の症例24名のうち、10名（1856del91変異8名、R313G変異1名、H720R変異1名）に検出されたが、健常者72名にはいずれの変異も検出されなかった（第2表）。同様に、A604V変異出現頻度は、アレルギー（アトピー）疾患の症例において有意（ $P<0.001$ ）に高いことが示された（第3表）。

【0073】

第 2 表

ヘテロ接合体					
対象	数 (人)	R313G変異	1856del91変異	H720R変異	計
非アレルギー群	62	0	0	0	0
アレルギー群	75	1	8	1	10
IFN- $\gamma$ 産生量					
<20 pg/ml	24	1	8	1	10
$\geq 20$ pg/ml	51	0	0	0	0

【0074】

第 3 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=104)	アレルギー群 (n=102)	計(n=206)
A604V			
C/C	100	81	181

T/C	4	21*	25
-----	---	-----	----

\*P<0.001

【0075】

さらに下記のIL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子の変異5～7の存在が明らかになった（第4表参照）。

【0076】

遺伝子変異5（第7図参照）

第7図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子の1081番目の塩基CがTに置換しており、この塩基置換により、IL-12R $\beta$ 1鎖蛋白質の361番目のアミノ酸Arg（CGG）が、Trp（TGG）に置換する変異であった（R361W変異）。

【0077】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$ 1蛋白質の361番目のArgをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

【0078】

遺伝子変異6（第8図参照）

第8図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子の1094番目の塩基TがCに置換しており、この塩基置換によりIL-12R $\beta$ 1鎖蛋白質の365番目のアミノ酸Met（ATG）がThr（ACG）に置換する変異であった（M365T変異）。

【0079】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$ 1鎖蛋白質の365番目のメチオニンをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

【0080】

遺伝子変異7（第9図参照）

第9図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるよう

に、この遺伝子変異は、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子の1132番目の塩基GがCに置換しており、この塩基置換によりIL-12R $\beta$ 1鎖蛋白質の378番目のアミノ酸Gly (GGG) がArg (CGG) に置換する変異であった (G378R変異)。

## 【0081】

後述するように、この例のような、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子によってコードされるIL-12R $\beta$ 1鎖蛋白質の378番目のグリシンをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

## 【0082】

第4表に、上記の3種類の、IL-12R $\beta$ 1鎖遺伝子の変異の頻度を示した。アレルギー (アトピー) 疾患の患者では、健常者に比べて、いずれも高頻度の変異が認められた。

## 【0083】

第 4 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=50)	アレルギー群 (n=45)
R 3 6 1 W		
C/C	5 0	4 4
T/C	0	1
T/T	0	0
M 3 6 5 T		
T/T	3 3	2 2
C/T	5	8

C/C	1 2	1 5
G 3 7 8 R		
G/G	3 3	2 2
C/G	5	8
C/C	1 2	1 5

## 【0084】

さらに、IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子の変異について解析を行ったところ、アレルギー素因と関連する、下記の新たな変異が認められた。

## 【0085】

遺伝子変異 8 (第10図参照)

第10図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-18R $\alpha$  鎖遺伝子の950番目から952番目の3塩基CAGが欠失しており(950del13)、IL-18R $\alpha$  鎖蛋白質の317番目のアミノ酸Ala1個を欠いた、540個のアミノ酸残基からなる異常な蛋白質の合成が認められる変異であると考えられる。また、この変異は、ゲノムDNAの塩基配列には検出されないことから、オルターネイティブスプライシングによって生じるものと考えられた。

## 【0086】

本変異8を有するアレルギー(アトピー)疾患患者、および、本変異8が認められないアレルギー(アトピー)疾患患者より、上述のごとく末梢血単核球を分離し、IL-4、およびIL-18存在下にて細胞を培養し、培養上清中に分泌されたIgE量を測定した。その結果、本変異8が認められないアレルギー(アトピー)疾患患者に由来する単核球においては、IL-4により惹起されるIgE産生がIL-18濃度依存的に抑制されるのに対して、本変異8を有する患者由来単核球においてはIL-18

共存による抑制が認められなかった（第11図）。

### 【0087】

このことは、本変異8が認められる者は、IL-18を介する情報伝達により産生されるINF- $\gamma$ による抑制がなされていないことを表し、IL-18Rに機能的異常が存在することを示している。この結果より、本遺伝子変異8により、IL-18Rに異常を生じ、INF- $\gamma$ の産生が出来ず、INF- $\gamma$ によるIgE産生の抑制が機能しないことが示された。また、本変異は、アレルギー（アトピー）疾患症例において有意( $P=0.0179$ )に高い頻度で出現していることが示された（第5表）。

### 【0088】

第 5 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=41)	アレルギー群 (n=39)	計(n=80)
950del3			
wild/wild	9	4*	13
del3/wild	30	26*	56
del3/del3	2	9*	11

\* $P=0.0179$

### 【0089】

さらに、INF- $\gamma$  R1鎖遺伝子の変異について解析を行ったところ、アレルギー素因と関連する、下記の新たな変異が認められた。

### 【0090】

#### 遺伝子変異9（第12図参照）

第12図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるよう

に、この遺伝子変異は、INF- $\gamma$  R1鎖遺伝子の1400番目の塩基Tが、Cに置換しており、この塩基置換により、INF- $\gamma$  R1鎖蛋白質の467番目のアミノ酸Leu (CTT) がPro (CCT) に置換していた (L467P変異)。このL467P変異はSTAT1結合部の近傍に生じていることから、本変異9により、重要な情報伝達分子である、STAT1が結合できなくなり、シグナルの伝達が抑制されるものと考えられる。

#### 【0091】

また、本変異9の家系解析より、本変異9は 気管支喘息、あるいはアトピー性皮膚炎の疾患を有する家族にのみ認められることから、このL467P変異に代表される、INF- $\gamma$  R1鎖蛋白質の467番目のロイシンをコードする部位の変異は、気管支喘息、あるいはアトピー性皮膚炎に特徴的な遺伝子変異であると考えられる (第13図: 図中、BAは、気管支喘息を表し、ARは、アレルギー性鼻炎を表す)。さらに、アレルギー (アトピー) 疾患症例114名と非アレルギー (アトピー) 群102名を対象に、L467P変異について検討したところ、本変異9は、アレルギー (アトピー) 疾患症例6名 (2.8%) にのみ変異が検出された。

#### 【0092】

この結果より、L467P変異は、アレルギー (アトピー) 性疾患の原因の一つであることが示された (第6表)。

#### 【0093】

第 6 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=102)	アレルギー群 (n=14)	計 (n=216)
L467P			
T/T	102	108*	210 (97.2%)
C/T	0	6*	6 (2.8%)



C/C	0	0	0 (0%)	
-----	---	---	--------	--

\*P=0.033

【 0 0 9 4 】

【発明の効果】

本発明により、アレルギーに関連する遺伝子変異を用いた、アレルギー素因を規定している原因遺伝子を検出可能な、遺伝子変異の検出方法が提供される。

【 0 0 9 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.

KONDO, Naomi

<120> Method of Detecting Allergy

<130> PBM78

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3400

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2589)

&lt;400&gt; 1

atg gca cat act ttt aga gga tgc tca ttg gca ttt atg ttt ata atc 48

Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile

1

5

10

15

acg tgg ctg ttg att aaa gca aaa ata gat gcg tgc aag aga ggc gat 96

Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp

20

25

30

gtg act gtg aag cct tcc cat gta att tta ctt gga tcc act gtc aat 144

Val Thr Val Lys Pro Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn

35

40

45

att aca tgc tct ttg aag ccc aga caa ggc tgc ttt cac tat tcc aga 192

Ile Thr Cys Ser Leu Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg

50

55

60

cgt aac aag tta atc ctg tac aag ttt gac aga aga atc aat ttt cac 240

Arg Asn Lys Leu Ile Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His

65

70

75

80

cat ggc cac tcc ctc aat tct caa gtc aca ggt ctt ccc ctt ggt aca 288

His Gly His Ser Leu Asn Ser Gln Val Thr Gly Leu Pro Leu Gly Thr

85

90

95

acc ttg ttt gtc tgc aaa ctg gcc tgt atc aat agt gat gaa att caa 336  
Thr Leu Phe Val Cys Lys Leu Ala Cys Ile Asn Ser Asp Glu Ile Gln  
100 105 110

ata tgt gga gca gag atc ttc gtt ggt gtt gct cca gaa cag cct caa 384  
Ile Cys Gly Ala Glu Ile Phe Val Gly Val Ala Pro Glu Gln Pro Gln  
115 120 125

aat tta tcc tgc ata cag aag gga gaa cag ggg act gtg gcc tgc acc 432  
Asn Leu Ser Cys Ile Gln Lys Gly Glu Gln Gly Thr Val Ala Cys Thr  
130 135 140

tgg gaa aga gga cga gac acc cac tta tac act gag tat act cta cag 480  
Trp Glu Arg Gly Arg Asp Thr His Leu Tyr Thr Glu Tyr Thr Leu Gln  
145 150 155 160

cta agt gga cca aaa aat tta acc tgg cag aag caa tgt aaa gac att 528  
Leu Ser Gly Pro Lys Asn Leu Thr Trp Gln Lys Gln Cys Lys Asp Ile  
165 170 175

tat tgt gac tat ttg gac ttt gga atc aac ctc acc cct gaa tca cct 576  
Tyr Cys Asp Tyr Leu Asp Phe Gly Ile Asn Leu Thr Pro Glu Ser Pro  
180 185 190

gaa tcc aat ttc aca gcc aag gtt act gct gtc aat agt ctt gga agc 624  
Glu Ser Asn Phe Thr Ala Lys Val Thr Ala Val Asn Ser Leu Gly Ser  
195 200 205

tcc tct tca ctt cca tcc aca ttc aca ttc ttg gac ata gtg agg cct 672  
Ser Ser Ser Leu Pro Ser Thr Phe Thr Phe Leu Asp Ile Val Arg Pro  
210 215 220

ctt cct ccg tgg gac att aga atc aaa ttt caa aag gct tcc gtg agc 720  
Leu Pro Pro Trp Asp Ile Arg Ile Lys Phe Gln Lys Ala Ser Val Ser  
225 230 235 240

aga tgt acc ctt tat tgg aga gat gag gga ctg gta ctg ctt aat cga 768  
Arg Cys Thr Leu Tyr Trp Arg Asp Glu Gly Leu Val Leu Leu Asn Arg  
245 250 255

ctc aga tat cgg ccc agt aac agc agg ctc tgg aat atg gtt aat gtt 816  
Leu Arg Tyr Arg Pro Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val  
260 265 270

aca aag gcc aaa gga aga cat gat ttg ctg gat ctg aaa cca ttt aca 864  
Thr Lys Ala Lys Gly Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr  
275 280 285

gaa tat gaa ttt cag att tcc tct aag cta cat ctt tat aag gga agt 912  
Glu Tyr Glu Phe Gln Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser  
290 295 300

tgg agt gat tgg agt gaa tca ttg aga gca caa aca cca gaa gaa gag 960  
Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu  
305 310 315 320

cct act ggg atg tta gat gtc tgg tac atg aaa cgg cac att gac tac 1008

Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr  
 325 330 335

agt aga caa cag att tct ctt ttc tgg aag aat ctg agt gtc tca gag 1056  
 Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu  
 340 345 350

gca aga gga aaa att ctc cac tat cag gtg acc ttg cag gag ctg aca 1104  
 Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr  
 355 360 365

gga ggg aaa gcc atg aca cag aac atc aca gga cac acc tcc tgg acc 1152  
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr  
 370 375 380

aca gtc att cct aga acc gga aat tgg gct gtg gct gtg tct gca gca 1200  
 Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala  
 385 390 395 400

aat tca aaa ggc agt tct ctg ccc act cgt att aac ata atg aac ctg 1248  
 Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu  
 405 410 415

tgt gag gca ggg ttg ctg gct cct cgc cag gtc tct gca aac tca gag 1296  
 Cys Glu Ala Gly Leu Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu  
 420 425 430

ggc atg gac aac att ctg gtg act tgg cag cct ccc agg aaa gat ccc 1344  
 Gly Met Asp Asn Ile Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro

435	440	445	
tct gct gtt cag gag tac gtg gtg gaa tgg aga gag ctc cat cca ggg	1392		
Ser Ala Val Gln Glu Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly			
450	455	460	
ggt gac aca cag gtc cct cta aac tgg cta cgg agt cga ccc tac aat	1440		
Gly Asp Thr Gln Val Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn			
465	470	475	480
gtg tct gct ctg att tca gag aac ata aaa tcc tac atc tgt tat gaa	1488		
Val Ser Ala Leu Ile Ser Glu Asn Ile Lys Ser Tyr Ile Cys Tyr Glu			
485	490	495	
atc cgt gtg tat gca ctc tca ggg gat caa gga gga tgc agc tcc atc	1536		
Ile Arg Val Tyr Ala Leu Ser Gly Asp Gln Gly Gly Cys Ser Ser Ile			
500	505	510	
ctg ggt aac tct aag cac aaa gca cca ctg agt ggc ccc cac att aat	1584		
Leu Gly Asn Ser Lys His Lys Ala Pro Leu Ser Gly Pro His Ile Asn			
515	520	525	
gcc atc aca gag gaa aag ggg agc att tta att tca tgg aac agc att	1632		
Ala Ile Thr Glu Glu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Ser Trp Asn Ser Ile			
530	535	540	
cca gtc cag gag caa atg ggc tgc ctc ctc cat tat agg ata tac tgg	1680		
Pro Val Gln Glu Gln Met Gly Cys Leu Leu His Tyr Arg Ile Tyr Trp			
545	550	555	560

aag gaa cgg gac tcc aac tcc cag cct cag ctc tgt gaa att ccc tac 1728

Lys Glu Arg Asp Ser Asn Ser Gln Pro Gln Leu Cys Glu Ile Pro Tyr

565

570

575

aga gtc tcc caa aat tca cat cca ata aac agc ctg cag ccc cga gtg 1776

Arg Val Ser Gln Asn Ser His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val

580

585

590

aca tat gtc ctg tgg atg aca gct ctg aca gct gct ggt gaa agt tcc 1824

Thr Tyr Val Leu Trp Met Thr Ala Leu Thr Ala Ala Gly Glu Ser Ser

595

600

605

cac gga aat gag agg gaa ttt tgt ctg caa ggt aaa gcc aat tgg atg 1872

His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met

610

615

620

gcg ttt gtg gca cca agc att tgc att gct atc atc atg gtg ggc att 1920

Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile

625

630

635

640

ttc tca acg cat tac ttc cag caa aag gtg ttt gtt ctc cta gca gcc 1968

Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala

645

650

655

ctc aga cct cag tgg tgt agc aga gaa att cca gat cca gca aat agc 2016

Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser

660

665

670

act tgc gct aag aaa tat ccc att gca gag gag aag aca cag ctg ccc 2064  
Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro  
675 680 685

ttg gac agg ctc ctg ata gac tgg ccc acg cct gaa gat cct gaa ccg 2112  
Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro  
690 695 700

ctg gtc atc agt gaa gtc ctt cat caa gtg acc cca gtt ttc aga cat 2160  
Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His  
705 710 715 720

ccc ccc tgc tcc aac tgg cca caa agg gaa aaa gga atc caa ggt cat 2208  
Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His  
725 730 735

cag gcc tct gag aaa gac atg atg cac agt gcc tca agc cca cca cct 2256  
Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro  
740 745 750

cca aga gct ctc caa gct gag agc aga caa ctg gtg gat ctg tac aag 2304  
Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys  
755 760 765

gtg ctg gag agc agg ggc tcc gac cca aag cca gaa aac cca gcc tgt 2352  
Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys  
770 775 780

ccc tgg acg gtg ctc cca gca ggt gac ctt ccc acc cat gat ggc tac 2400



Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr  
785 790 795 800

tta ccc tcc aac ata gat gac ctc ccc tca cat gag gca cct ctc gct 2448  
Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala  
805 810 815

gac tct ctg gaa gaa ctg gag cct cag cac atc tcc ctt tct gtt ttc 2496  
Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe  
820 825 830

ccc tca agt tct ctt cac cca ctc acc ttc tcc tgt ggt gat aag ctg 2544  
Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu  
835 840 845

act ctg gat cag tta aag atg agg tgt gac tcc ctc atg ctc tga 2589  
Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu  
850 855 860

gtggtgaggc ttcaagcctt aaagtcagtg tgccctcaac cagcacagcc tgccccaatt 2649

ccccagcccc ctgctccagc agctgtcatc tctgggtgcc accatcggtc tggctgcagc 2709

tagaggacag gcaagccagc tctgggggag tcttaggaac tgggagttgg tcttcactca 2769

gatgcctcat cttgcctttc ccagggcctt aaaattacat ctttcactgt gtggacctag 2829

agactccaac ttgaattcct agtaactttc ttggtatgct ggccagaaag ggaaatgagg 2889

aggagagtag aaaccacagc tccttagtagt aatggcatac agtctagagg accattcatg 2949  
caatgactat ttctaaagca cctgctacac agcaggctgt acacagcaga tcagtactgt 3009  
tcaacagaac ttcttgagat gatggaaatg ttctacctt gcactcactg tccagtacat 3069  
tagacactag gcacattggc tgtaaatcac ttggaatgtg tttagcttga ctgaggaatt 3129  
aaattttgat tgtaaattta aatcgccaca catggctagt ggctactgta ttggagtgc 3189  
cagctctaga tggctcctag attattgaga gcctccaaaa caaatcaacc tagttctata 3249  
gatgaagaca taaaagacac tggtaaacac caatgtaaaa gggcccccaa ggtgggtcatg 3309  
actggtctca ttgacagaag tctaagaatg tacctttttc tggccgggcg tggtagctca 3369  
tgcctgtaat cccagcactt tgggaggctg a 3400

<210> 2

<211> 2036

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1989)

<400> 2

atg gag ccg ctg gtg acc tgg gtg gtc ccc ctc ctc ttc ctc ttc ctg 48  
 Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu  
 1 5 10 15

ctg tcc agg cag ggc gct gcc tgc aga acc agt gag tgc tgt ttt cag 96  
 Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe Gln  
 20 25 30

gac ccg cca tat ccg gat gca gac tca ggc tcg gcc tcg ggc cct agg 144  
 Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro Arg  
 35 40 45

gac ctg aga tgc tat cgg ata tcc agt gat cgt tac gag tgc tcc tgg 192  
 Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser Trp  
 50 55 60

cag tat gag ggt ccc aca gct ggg gtc agc cac ttc ctg cgg tgt tgc 240  
 Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys Cys  
 65 70 75 80

ctt agc tcc ggg cgc tgc tgc tac ttc gcc gcc ggc tca gcc acc agg 288  
 Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr Arg  
 85 90 95

ctg cag ttc tcc gac cag gct ggg gtg tct gtg ctg tac act gtc aca 336  
 Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val Thr  
 100 105 110

ctc tgg gtg gaa tcc tgg gcc agg aac cag aca gag aag tct cct gag 384

Leu Trp Val Glu Ser Trp Ala Arg Asn Gln Thr Glu Lys Ser Pro Glu  
 115 120 125

gtg acc ctg cag ctc tac aac tca gtt aaa tat gag cct cct ctg gga 432  
 Val Thr Leu Gln Leu Tyr Asn Ser Val Lys Tyr Glu Pro Pro Leu Gly  
 130 135 140

gac atc aag gtg tcc aag ttg gcc ggg cag ctg cgt atg gag tgg gag 480  
 Asp Ile Lys Val Ser Lys Leu Ala Gly Gln Leu Arg Met Glu Trp Glu  
 145 150 155 160

acc ccg gat aac cag gtt ggt gct gag gtg cag ttc cgg cac cgg aca 528  
 Thr Pro Asp Asn Gln Val Gly Ala Glu Val Gln Phe Arg His Arg Thr  
 165 170 175

ccc agc agc cca tgg aag ttg ggc gac tgc gga cct cag gat gat gat 576  
 Pro Ser Ser Pro Trp Lys Leu Gly Asp Cys Gly Pro Gln Asp Asp Asp  
 180 185 190

act gag tcc tgc ctc tgc ccc ctg gag atg aat gtg gcc cag gaa ttc 624  
 Thr Glu Ser Cys Leu Cys Pro Leu Glu Met Asn Val Ala Gln Glu Phe  
 195 200 205

cag ctc cga cga cgg cag ctg ggg agc caa gga agt tcc tgg agc aag 672  
 Gln Leu Arg Arg Arg Gln Leu Gly Ser Gln Gly Ser Ser Trp Ser Lys  
 210 215 220

tgg agc agc ccc gtg tgc gtt ccc cct gaa aac ccc cca cag cct cag 720  
 Trp Ser Ser Pro Val Cys Val Pro Pro Glu Asn Pro Pro Gln Pro Gln

225	230	235	240	
gtg aga ttc tcg gtg gag cag ctg ggc cag gat ggg agg agg cgg ctg				768
Val Arg Phe Ser Val Glu Gln Leu Gly Gln Asp Gly Arg Arg Arg Leu				
	245	250	255	
acc ctg aaa gag cag cca acc cag ctg gag ctt cca gaa ggc tgt caa				816
Thr Leu Lys Glu Gln Pro Thr Gln Leu Glu Leu Pro Glu Gly Cys Gln				
	260	265	270	
ggg ctg gcg cct ggc acg gag gtc act tac cga cta cag ctc cac atg				864
Gly Leu Ala Pro Gly Thr Glu Val Thr Tyr Arg Leu Gln Leu His Met				
	275	280	285	
ctg tcc tgc ccg tgt aag gcc aag gcc acc agg acc ctg cac ctg ggg				912
Leu Ser Cys Pro Cys Lys Ala Lys Ala Thr Arg Thr Leu His Leu Gly				
	290	295	300	
aag atg ccc tat ctc tcg ggt gct gcc tac aac gtg gct gtc atc tcc				960
Lys Met Pro Tyr Leu Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Val Ala Val Ile Ser				
305	310	315	320	
tcg aac caa ttt ggt cct ggc ctg aac cag acg tgg cac att cct gcc				1008
Ser Asn Gln Phe Gly Pro Gly Leu Asn Gln Thr Trp His Ile Pro Ala				
	325	330	335	
gac acc cac aca gaa cca gtg gct ctg aat atc agc gtc gga acc aac				1056
Asp Thr His Thr Glu Pro Val Ala Leu Asn Ile Ser Val Gly Thr Asn				
	340	345	350	

ggg acc acc atg tat tgg cca gcc cgg gct cag agc atg acg tat tgc 1104  
Gly Thr Thr Met Tyr Trp Pro Ala Arg Ala Gln Ser Met Thr Tyr Cys  
355 360 365

att gaa tgg cag cct gtg ggc cag gac ggg ggc ctt gcc acc tgc agc 1152  
Ile Glu Trp Gln Pro Val Gly Gln Asp Gly Gly Leu Ala Thr Cys Ser  
370 375 380

ctg act gcg ccg caa gac ccg gat ccg gct gga atg gca acc tac agc 1200  
Leu Thr Ala Pro Gln Asp Pro Asp Pro Ala Gly Met Ala Thr Tyr Ser  
385 390 395 400

tgg agt cga gag tct ggg gca atg ggg cag gaa aag tgt tac tac att 1248  
Trp Ser Arg Glu Ser Gly Ala Met Gly Gln Glu Lys Cys Tyr Tyr Ile  
405 410 415

acc atc ttt gcc tct gcg cac ccc gag aag ctc acc ttg tgg tct acg 1296  
Thr Ile Phe Ala Ser Ala His Pro Glu Lys Leu Thr Leu Trp Ser Thr  
420 425 430

gtc ctg tcc acc tac cac ttt ggg ggc aat gcc tca gca gct ggg aca 1344  
Val Leu Ser Thr Tyr His Phe Gly Gly Asn Ala Ser Ala Ala Gly Thr  
435 440 445

ccg cac cac gtc tcg gtg aag aat cat agc ttg gac tct gtg tct gtg 1392  
Pro His His Val Ser Val Lys Asn His Ser Leu Asp Ser Val Ser Val  
450 455 460

gac tgg gca cca tcc ctg ctg agc acc tgt ccc ggc gtc cta aag gag 1440  
Asp Trp Ala Pro Ser Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Val Leu Lys Glu  
465 470 475 480

tat gtt gtc cgc tgc cga gat gaa gac agc aaa cag gtg tca gag cat 1488  
Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu His  
485 490 495

ccc gtg cag ccc aca gag acc caa gtt acc ctc agt ggc ctg cgg gct 1536  
Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala  
500 505 510

ggt gta gcc tac acg gtg cag gtg cga gca gac aca gcg tgg ctg agg 1584  
Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu Arg  
515 520 525

ggt gtc tgg agc cag ccc cag cgc ttc agc atc gaa gtg cag gtt tct 1632  
Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val Ser  
530 535 540

gat tgg ctc atc ttc ttc gcc tcc ctg ggg agc ttc ctg agc atc ctt 1680  
Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu  
545 550 555 560

ctc gtg ggc gtc ctt ggc tac ctt ggc ctg aac agg gcc gca cgg cac 1728  
Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His  
565 570 575

ctg tgc ccg ccg ctg ccc aca ccc tgt gcc agc tcc gcc att gag ttc 1776

Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe  
 580 585 590

cct gga ggg aag gag act tgg cag tgg atc aac cca gtg gac ttc cag 1824  
 Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln  
 595 600 605

gaa gag gca tcc ctg cag gag gcc ctg gtg gta gag atg tcc tgg gac 1872  
 Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp  
 610 615 620

aaa ggc gag agg act gag cct ctc gag aag aca gag cta cct gag ggt 1920  
 Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly  
 625 630 635 640

gcc cct gag ctg gcc ctg gat aca gag ttg tcc ttg gag gat gga gac 1968  
 Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp  
 645 650 655

agg tgc aag gcc aag atg tga tcgttgaggc tcagagaggg tgagtgactc 2019  
 Arg Cys Lys Ala Lys Met  
 660

gccccgaggct acgtagc 2036

<210> 3

<211> 2016

<212> DNA



&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1470)

&lt;400&gt; 3

atg gct ctc ctc ttt ctc cta ccc ctt gtc atg cag ggt gtg agc agg 48  
Met Ala Leu Leu Phe Leu Leu Pro Leu Val Met Gln Gly Val Ser Arg  
1 5 10 15

gct gag atg ggc acc gcg gat ctg ggg ccg tcc tca gtg cct aca cca 96  
Ala Glu Met Gly Thr Ala Asp Leu Gly Pro Ser Ser Val Pro Thr Pro  
20 25 30

act aat gtt aca att gaa tcc tat aac atg aac cct atc gta tat tgg 144  
Thr Asn Val Thr Ile Glu Ser Tyr Asn Met Asn Pro Ile Val Tyr Trp  
35 40 45

gag tac cag atc atg cca cag gtc cct gtt ttt acc gta gag gta aag 192  
Glu Tyr Gln Ile Met Pro Gln Val Pro Val Phe Thr Val Glu Val Lys  
50 55 60

aac tat ggt gtt aag aat tca gaa tgg att gat gcc tgc atc aat att 240  
Asn Tyr Gly Val Lys Asn Ser Glu Trp Ile Asp Ala Cys Ile Asn Ile  
65 70 75 80

tct cat cat tat tgt aat att tct gat cat gtt ggt gat cca tca aat 288  
Ser His His Tyr Cys Asn Ile Ser Asp His Val Gly Asp Pro Ser Asn

85

90

95

tct ctt tgg gtc aga gtt aaa gcc agg gtt gga caa aaa gaa tct gcc 336

Ser Leu Trp Val Arg Val Lys Ala Arg Val Gly Gln Lys Glu Ser Ala

100

105

110

tat gca aag tca gaa gaa ttt gct gta tgc cga gat gga aaa att gga 384

Tyr Ala Lys Ser Glu Glu Phe Ala Val Cys Arg Asp Gly Lys Ile Gly

115

120

125

cca cct aaa ctg gat atc aga aag gag gag aag caa atc atg att gac 432

Pro Pro Lys Leu Asp Ile Arg Lys Glu Glu Lys Gln Ile Met Ile Asp

130

135

140

ata ttt cac cct tca gtt ttt gta aat gga gac gag cag gaa gtc gat 480

Ile Phe His Pro Ser Val Phe Val Asn Gly Asp Glu Gln Glu Val Asp

145

150

155

160

tat gat ccc gaa act acc tgt tac att agg gtg tac aat gtg tat gtg 528

Tyr Asp Pro Glu Thr Thr Cys Tyr Ile Arg Val Tyr Asn Val Tyr Val

165

170

175

aga atg aac gga agt gag atc cag tat aaa ata ctc acg cag aag gaa 576

Arg Met Asn Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Lys Ile Leu Thr Gln Lys Glu

180

185

190

gat gat tgt gac gag att cag tgc cag tta gcg att cca gta tcc tca 624

Asp Asp Cys Asp Glu Ile Gln Cys Gln Leu Ala Ile Pro Val Ser Ser

195

200

205

ctg aat tct cag tac tgt gtt tca gca gaa gga gtc tta cat gtg tgg 672  
Leu Asn Ser Gln Tyr Cys Val Ser Ala Glu Gly Val Leu His Val Trp  
210 215 220

ggc gtt aca act gaa aag tca aaa gaa gtt tgt att acc att ttc aat 720  
Gly Val Thr Thr Glu Lys Ser Lys Glu Val Cys Ile Thr Ile Phe Asn  
225 230 235 240

agc agt ata aaa ggt tct ctt tgg att cca gtt gtt gct gct tta cta 768  
Ser Ser Ile Lys Gly Ser Leu Trp Ile Pro Val Val Ala Ala Leu Leu  
245 250 255

ctc ttt cta gtg ctt agc ctg gta ttc atc tgt ttt tat att aag aaa 816  
Leu Phe Leu Val Leu Ser Leu Val Phe Ile Cys Phe Tyr Ile Lys Lys  
260 265 270

att aat cca ttg aag gaa aaa agc ata ata tta ccc aag tcc ttg atc 864  
Ile Asn Pro Leu Lys Glu Lys Ser Ile Ile Leu Pro Lys Ser Leu Ile  
275 280 285

tct gtg gta aga agt gct act tta gag aca aaa cct gaa tca aaa tat 912  
Ser Val Val Arg Ser Ala Thr Leu Glu Thr Lys Pro Glu Ser Lys Tyr  
290 295 300

gta tca ctc atc acg tca tac cag cca ttt tcc tta gaa aag gag gtg 960  
Val Ser Leu Ile Thr Ser Tyr Gln Pro Phe Ser Leu Glu Lys Glu Val  
305 310 315 320

gtc tgt gaa gag ccg ttg tct cca gca aca gtt cca ggc atg cat acc 1008

Val Cys Glu Glu Pro Leu Ser Pro Ala Thr Val Pro Gly Met His Thr

325

330

335

gaa gac aat cca gga aaa gtg gaa cat aca gaa gaa ctt tct agt ata 1056

Glu Asp Asn Pro Gly Lys Val Glu His Thr Glu Glu Leu Ser Ser Ile

340

345

350

aca gaa gtg gtg act act gaa gaa aat att cct gac gtg gtc ccg ggc 1104

Thr Glu Val Val Thr Thr Glu Glu Asn Ile Pro Asp Val Val Pro Gly

355

360

365

agc cat ctg act cca ata gag aga gag agt tct tca cct tta agt agt 1152

Ser His Leu Thr Pro Ile Glu Arg Glu Ser Ser Ser Pro Leu Ser Ser

370

375

380

aac cag tct gaa cct ggc agc atc gct tta aac tcg tat cac tcc aga 1200

Asn Gln Ser Glu Pro Gly Ser Ile Ala Leu Asn Ser Tyr His Ser Arg

385

390

395

400

aat tgt tct gag agt gat cac tcc aga aat ggt ttt gat act gat tcc 1248

Asn Cys Ser Glu Ser Asp His Ser Arg Asn Gly Phe Asp Thr Asp Ser

405

410

415

agc tgt ctg gaa tca cat agc tcc tta tct gac tca gaa ttt ccc cca 1296

Ser Cys Leu Glu Ser His Ser Ser Leu Ser Asp Ser Glu Phe Pro Pro

420

425

430

aat aat aaa ggt gaa ata aaa aca gaa gga caa gag ctc ata acc gta 1344

Asn Asn Lys Gly Glu Ile Lys Thr Glu Gly Gln Glu Leu Ile Thr Val  
435 440 445

ata aaa gcc ccc acc tcc ttt ggt tat gat aaa cca cat gtg cta gtg 1392  
Ile Lys Ala Pro Thr Ser Phe Gly Tyr Asp Lys Pro His Val Leu Val  
450 455 460

gat cta ctt gtg gat gat agc ggt aaa gag tcc ttg att ggt tat aga 1440  
Asp Leu Leu Val Asp Asp Ser Gly Lys Glu Ser Leu Ile Gly Tyr Arg  
465 470 475 480

cca aca gaa gat tcc aaa gaa ttt tca tga gatcagctaa gttgcaccaa 1490  
Pro Thr Glu Asp Ser Lys Glu Phe Ser  
485 490

ctttgaagtc tgattttcct ggacagtttt ctgctttaat ttcattgaaaa gattatgatc 1550

tcagaaattg tatcttagtt ggtatcaacc aaatggagtg acttagtgta catgaaagcg 1610

taaagaggat gtgtggcatt ttcacttttg gcttgtaaag tacagacttt tttttttttt 1670

taaacaaaaa aagcattgta acttatgaac cttacatcc agatagggtta ccagtaacgg 1730

aacatatcca gtactcctgg ttcctagggtg agcaggtgat gccccaggga cctttgtagc 1790

cacttcactt tttttctttt ctctgccttg gtatagcata tgtgttttgt aagtttatgc 1850

atacagtaat ttaagtaat ttcagaagaa attctcgaag cttttcaaaa ttggacttaa 1910

aatctaattc aaactaatag aattaatgga atatgtaaag agaaacgtgt atatttttta 1970

tgaacatta cagttagaga tttttaata aagaatttta aaactc 2016

<210> 4

<211> 3498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1626)

<400> 4

atg aat tgt aga gaa tta ccc ttg acc ctt tgg gtg ctt ata tct gta 48

Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val

1

5

10

15

agc act gca gaa tct tgt act tca cgt ccc cac att act gtg gtt gaa 96

Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu

20

25

30

ggg gaa cct ttc tat ctg aaa cat tgc tcg tgt tca ctt gca cat gag 144

Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu

35

40

45

att gaa aca acc acc aaa agc tgg tac aaa agc agt gga tca cag gaa 192

Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu

50

55

60

cat gtg gag ctg aac cca agg agt tcc tcg aga att gct ttg cat gat 240

His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp

65

70

75

80

tgt gtt ttg gag ttt tgg cca gtt gag ttg aat gac aca gga tct tac 288

Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr

85

90

95

ttt ttc caa atg aaa aat tat act cag aaa tgg aaa tta aat gtc atc 336

Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile

100

105

110

aga aga aat aaa cac agc tgt ttc act gaa aga caa gta act agt aaa 384

Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys

115

120

125

att gtg gaa gtt aaa aaa ttt ttt cag ata acc tgt gaa aac agt tac 432

Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr

130

135

140

tat caa aca ctg gtc aac agc aca tca ttg tat aag aac tgt aaa aag 480

Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys

145

150

155

160

cta cta ctg gag aac aat aaa aac cca acg ata aag aag aac gcc gag 528

Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu

165

170

175

ttt gaa gat cag ggg tat tac tcc tgc gtg cat ttc ctt cat cat aat 576  
 Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn  
 180 185 190

gga aaa cta ttt aat atc acc aaa acc ttc aat ata aca ata gtg gaa 624  
 Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu  
 195 200 205

gat cgc agt aat ata gtt ccg gtt ctt ctt gga cca aag ctt aac cat 672  
 Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His  
 210 215 220

gtt gca gtg gaa tta gga aaa aac gta agg ctc aac tgc tct gct ttg 720  
 Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu  
 225 230 235 240

ctg aat gaa gag gat gta att tat tgg atg ttc ggg gaa gaa aat gga 768  
 Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly  
 245 250 255

tcg gat cct aat ata cat gaa gag aaa gaa atg aga att atg act cca 816  
 Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro  
 260 265 270

gaa ggc aaa tgg cat gct tca aaa gta ttg aga att gaa aat att ggt 864  
 Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly  
 275 280 285



gaa agc aat cta aat gtt tta tat aat tgc act gtg gcc agc acg gga 912  
Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly  
290 295 300

ggc aca gac acc aaa agc ttc atc ttg gtg aga aaa gca gac atg gct 960  
Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala  
305 310 315 320

gat atc cca ggc cac gtc ttc aca aga gga atg atc ata gct gtt ttg 1008  
Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu  
325 330 335

atc ttg gtg gca gta gtg tgc cta gtg act gtg tgt gtc att tat aga 1056  
Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg  
340 345 350

gtt gac ttg gtt cta ttt tat aga cat tta acg aga aga gat gaa aca 1104  
Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr  
355 360 365

tta aca gat gga aaa aca tat gat gct ttt gtg tct tac cta aaa gaa 1152  
Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu  
370 375 380

tgc cga cct gaa aat gga gag gag cac acc ttt gct gtg gag att ttg 1200  
Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu  
385 390 395 400

ccc agg gtg ttg gag aaa cat ttt ggg tat aag tta tgc ata ttt gaa 1248

Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu

405

410

415

agg gat gta gtg cct gga gga gct gtt gtt gat gaa atc cac tca ctg 1296

Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu

420

425

430

ata gag aaa agc cga aga cta atc att gtc cta agt aaa agt tat atg 1344

Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met

435

440

445

tct aat gag gtc agg tat gaa ctt gaa agt gga ctc cat gaa gca ttg 1392

Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu

450

455

460

gtg gaa aga aaa att aaa ata atc tta att gaa ttt aca cct gtt act 1440

Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr

465

470

475

480

gac ttc aca ttc ttg ccc caa tca cta aag ctt ttg aaa tct cac aga 1488

Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg

485

490

495

gtt ctg aag tgg aag gcc gat aaa tct ctt tct tat aac tca agg ttc 1536

Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe

500

505

510

tgg aag aac ctt ctt tac tta atg cct gca aaa aca gtc aag cca ggt 1584

Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly

515

520

525

aga gac gaa ccg gaa gtc ttg cct gtt ctt tcc gag tct taa 1626

Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser

530

535

540

tcttcagaaa cagtgaacgc caaaaagaac tcaagatatt ctggggactg agcatatgaa 1686

cctgttcata acaaaggctg tgactcgaaa taattaactt tgtcaaaatc ctgctcacia 1746

tttgaagatg aaacttgtca ttaggttggc gggaatgaga ctaaagattg cgctgtgggc 1806

tgtggtcacg tgctcccaga agacctggaa ttcaaaagaa atggagctat tctttttctc 1866

cctctttcat aactggatgc agctgctcat actcaatccc atattcagca agtgtgaagc 1926

tggacgtgat gcaaaataac cgatgcccta caaaaagggc gcatctttaa gagttttaat 1986

gccagtgcct aattcgaatg aggggatttt aagtgtctga agaggcattt tctagggacc 2046

agtgggtgac tgagtaactg aaatgctgct ttcactccct aacaccatgg atctggttgt 2106

gcataggatg tgggaggagg ggctggcagg gccgccttca gaggctgcag ggcctcagcc 2166

tcaggatgca tttaatgtat cctggccaca gttgcagcca acggttcttg aaagctcggt 2226

aaggccctgc aacgcagagc ctgcttatgt ggatctatct atgggaactt cttaaaagga 2286

ccccagaata gctctttatc tttcacaaga gacacaaatt ctaattgagt taattatctg 2346

ggcctttcac tttggatgct ctgaaacatt tgttgatfff gtgtgaatgt ttatatcaaa 2406  
atgtttgccca ggttggtatta gccattgaat agcaaaaaac tgatagtac ttgcttgfff 2466  
tttaaaaatt acatattaaa aatgcccttg gcataaggca gcatgggtgtg gcagttaaga 2526  
gatgggctgt gcagcccatc ctgagctcca gtcctgagtt tgctacttac ttctgtggcc 2586  
tctggaacct tatccaacct cttgggtgctt cagtttcctc atctgtgaaa ttagaattta 2646  
taataattgc acctacctcc caggggtaac taaatgaata aatataataa agtacttaca 2706  
gtggttcctg acacagactc agcactccgt cagtgttgcc atgactatff ttattatcat 2766  
tattaatgat tacttagatc aattatfftag cagtggacta atggaagcta cagagcaggg 2826  
aagggagca gatctagga ggaaggcagt tttgatttga ggaggtttgc acatgtagag 2886  
aagcatactg gagaagcata tccagagggc gaaagatac tctccattgt gcatctgcct 2946  
cttttgacgt tggaagacac atgtcttact ccccaaaggg agcccagcac tgggagcctt 3006  
cttgatgatc tcaaaaataa tagctattca agaaaatcac caagtgactg tgaaccgctc 3066  
agttcggaag gctgggttaga acatgtggga gcaacatgaa tgttctacaa aagtttaag 3126  
cagagattgt ttcaaatggg ttagtagat attactgaaa accaaaaaag agtgagattg 3186

tcagtgtgaag aatgtgattt aatgtttgta gtgcttacaa ttttgtgtac caactggatg 3246

actaaaaaga gtaaaataac ttaattaata gctcataattt tatgtgtgaa aacatgttag 3306

tgaacatata taatcaaaat agatttcatt gctattgcat agtctctaata acatagaatg 3366

attttgcttt tctcttttat tatacttgct ttaaaatact tgaaatatat tttgcattaa 3426

atgcatttca agttaaatgt cttaaagtga tacattagat gtgtgtttta aaatgcataa 3486

aacacgttga aa 3498

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctcctcgaac caatttggtc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ctgcacttcg atgctgaagc 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cggagtttcta taccagagtt g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acatctaaca tcccagtagg c

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gatgacagct ctgacagctg

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggcctgatga ccttggatt

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ctgctctgct ttgctgaatg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

tcctcttgtg aagacgtggc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

cgtcatacca gccattttcc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

ttggtgcaac ttagctgac

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 インベーター・アッセイ法のあらましを略図化した図面である。

【図 2】 遺伝子変異 1 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 3】 遺伝子変異 2 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 4】 遺伝子変異 3 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 5】 遺伝子変異 4 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 6】 遺伝子変異 1 ～ 4 にかかわる被験者の、培養末梢血単核球が分泌した IgE 量を示す図面である。

【図 7】 遺伝子変異 5 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。



【図 8】 遺伝子変異 6 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 9】 遺伝子変異 7 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 10】 遺伝子変異 8 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

【図 11】 遺伝子変異 8 にかかわる、培養末梢血単核球が分泌したIgE量を示す図面である。

【図 12】 遺伝子変異 9 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

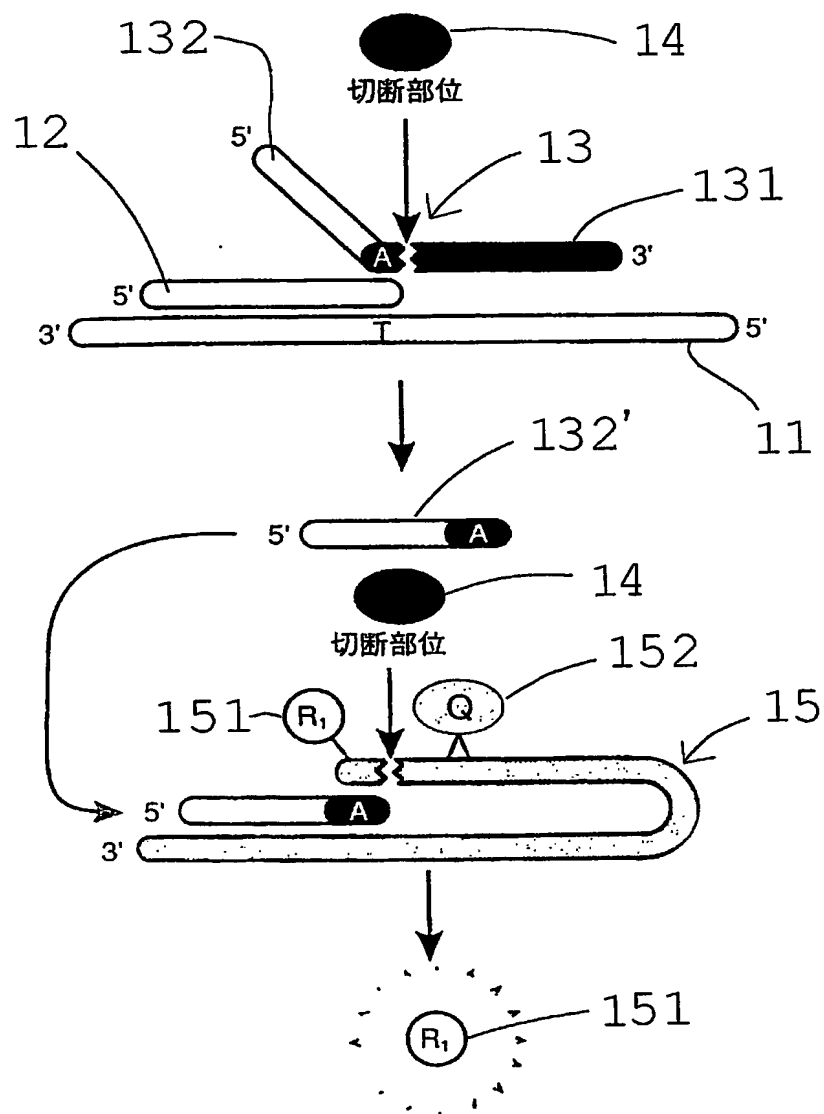
【図 13】 遺伝子変異 9 が認められる被験者の家系解析の結果を示す図面である。

【書類名】

図面

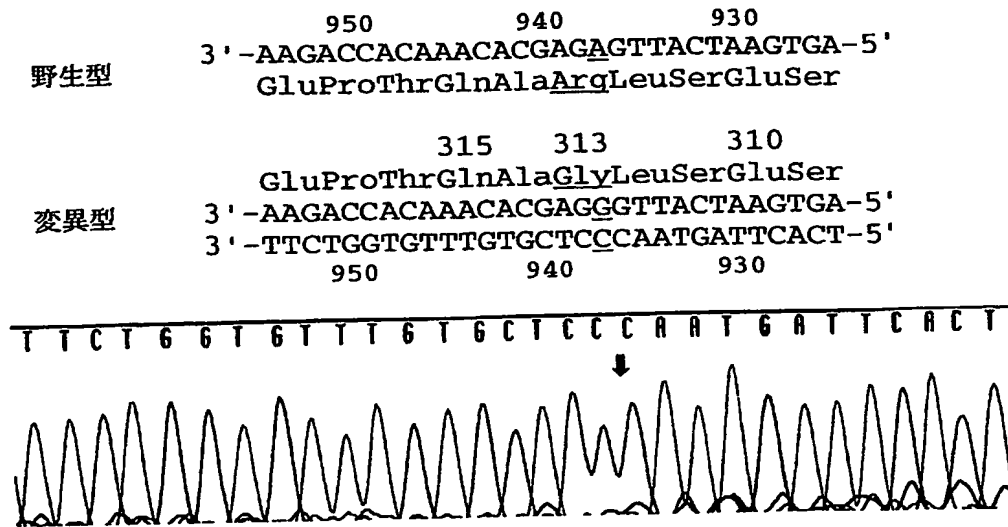
【図 1】

# 第 1 図



【図2】

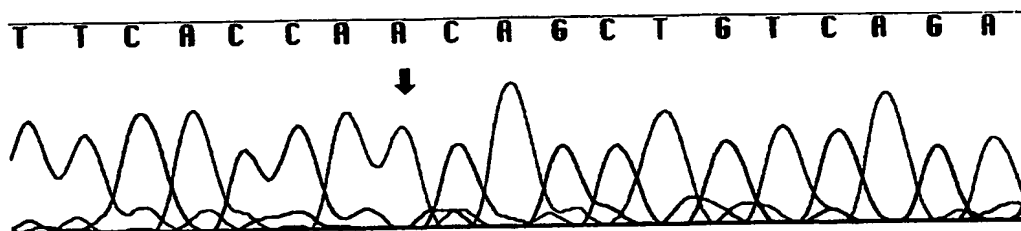
## 第 2 図



【図3】

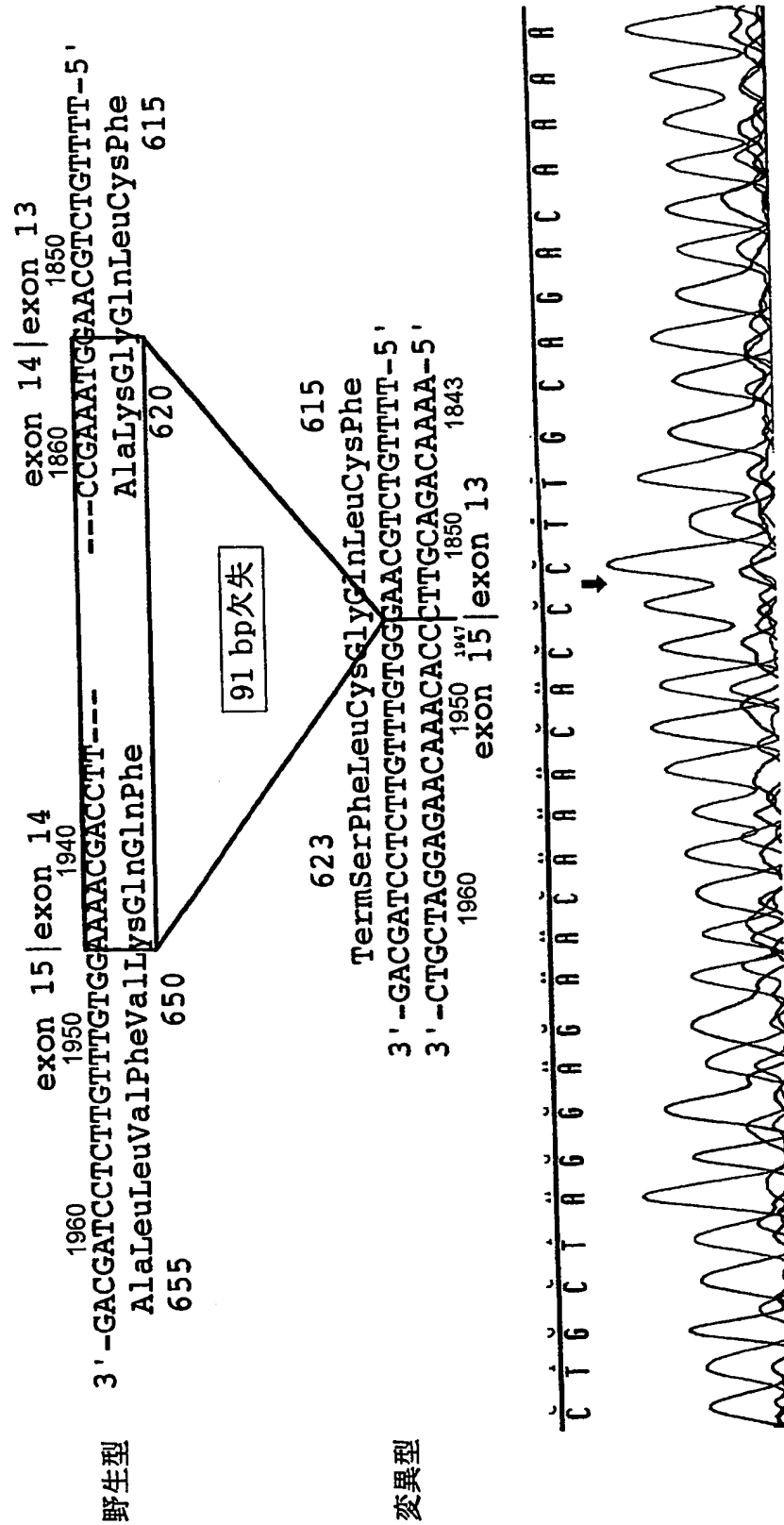
# 第 3 図

	1818	1810	1800
野生型	3'-AAGTGGT <u>CG</u> TCGACAGTCT-5'		
	GluGly <u>Ala</u> AlaThrLeu		
	604	601	
	GluGly <u>Val</u> AlaThrLeu		
変異型	3'-AAGTGGT <u>TG</u> TCGACAGTCT-5'		
	3'-TTCACCA <u>A</u> CAGCTGTCAGA-5'		
	1818	1810	1800



【図4】

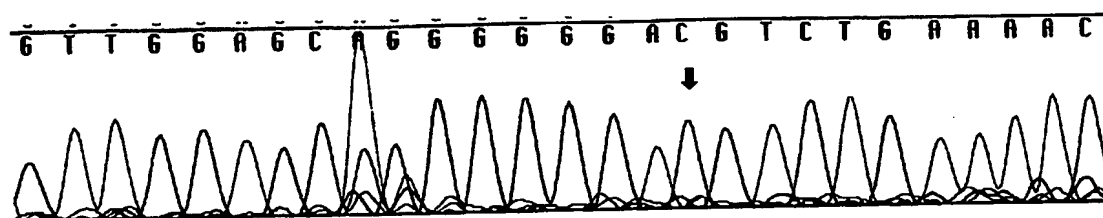
# 第 4 図



【図 5】

# 第 5 図

	2170	2160	2150
野生型	3'-CAACCTCGTCCCCCCTACAGACTTTTG-5'		
	AsnSerCysProProHisArgPheVal		
	725	720	717
	AsnSerCysProProArgArgPheVal		
変異型	3'-CAACCTCGTCCCCCTGCAGACTTTTG-5'		
	3'-GTTGGAGCAGGGGGACGTCTGAAAAC-5'		
	2170	2160	2150



【図 6】

## 第 6 図

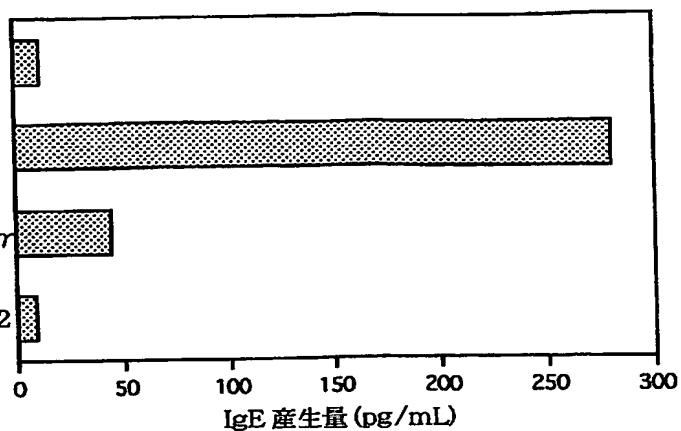
a) 非アレルギー者

細胞 + ダニ抗原

細胞 + ダニ抗原 + IL-4

細胞 + ダニ抗原 + IL-4 + IFN- $\gamma$ 

細胞 + ダニ抗原 + IL-4 + IL-12



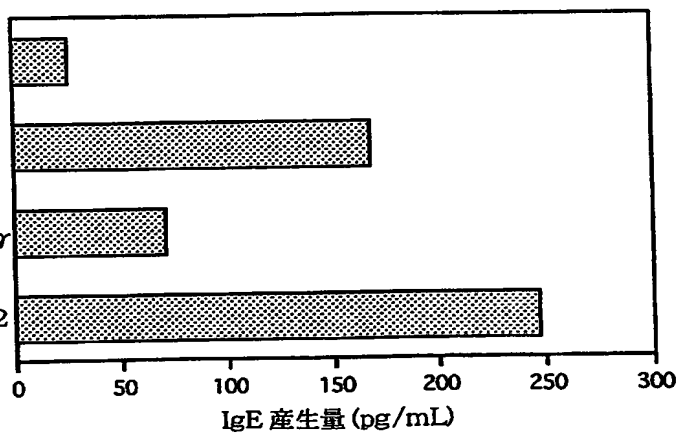
b) 1856del191のアレルギー患者

細胞 + ダニ抗原

細胞 + ダニ抗原 + IL-4

細胞 + ダニ抗原 + IL-4 + IFN- $\gamma$ 

細胞 + ダニ抗原 + IL-4 + IL-12



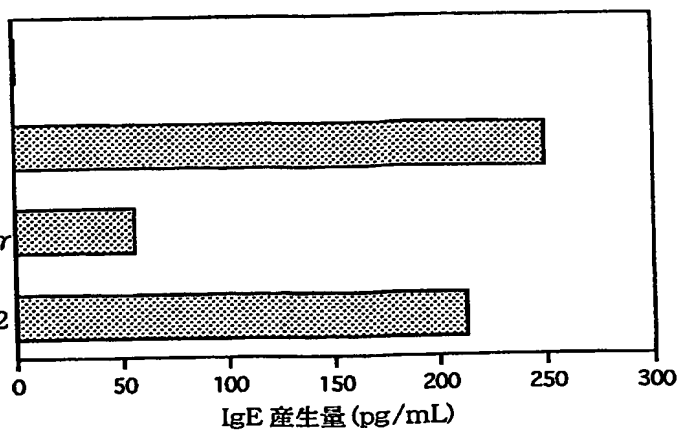
c) A604Vのアレルギー患者

細胞 + ダニ抗原

細胞 + ダニ抗原 + IL-4

細胞 + ダニ抗原 + IL-4 + IFN- $\gamma$ 

細胞 + ダニ抗原 + IL-4 + IL-12

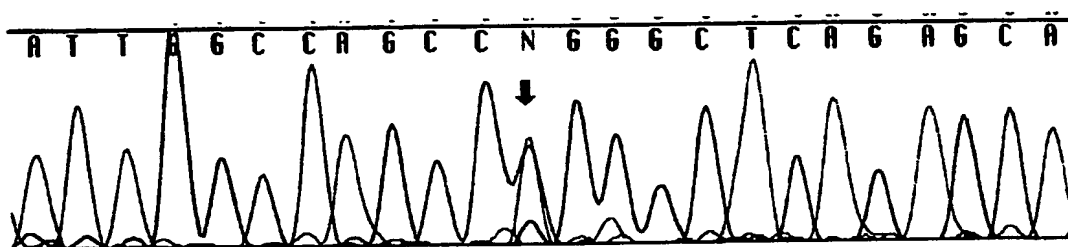


【図 7】

第 7 図

358      360                      364  
TrpProAlaArgAlaGlnSer  
                    Trp

5' -ATTGGCCAGCC/ GGGCTCAGAGCA-3'

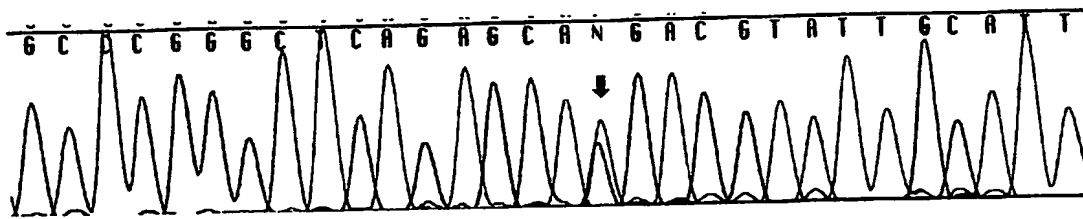




【図 8】

第 8 図

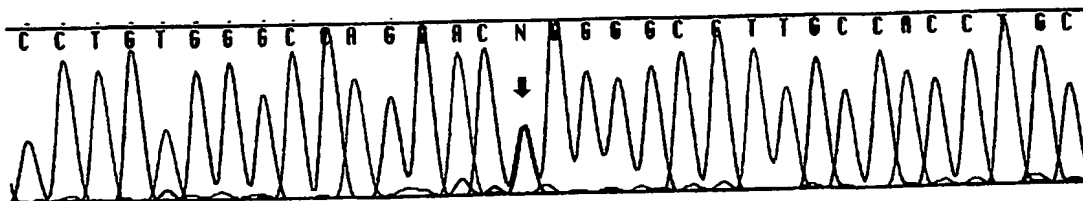
360 365 369  
AlaArgAlaGlnSer<sup>Met</sup>ThrTyrCysIle  
Thr  
T  
5'-GCCCCGGGCTCAGAGCA/GACGTATTGCATT-3'  
C  
1080 1090 1100



【図 9】

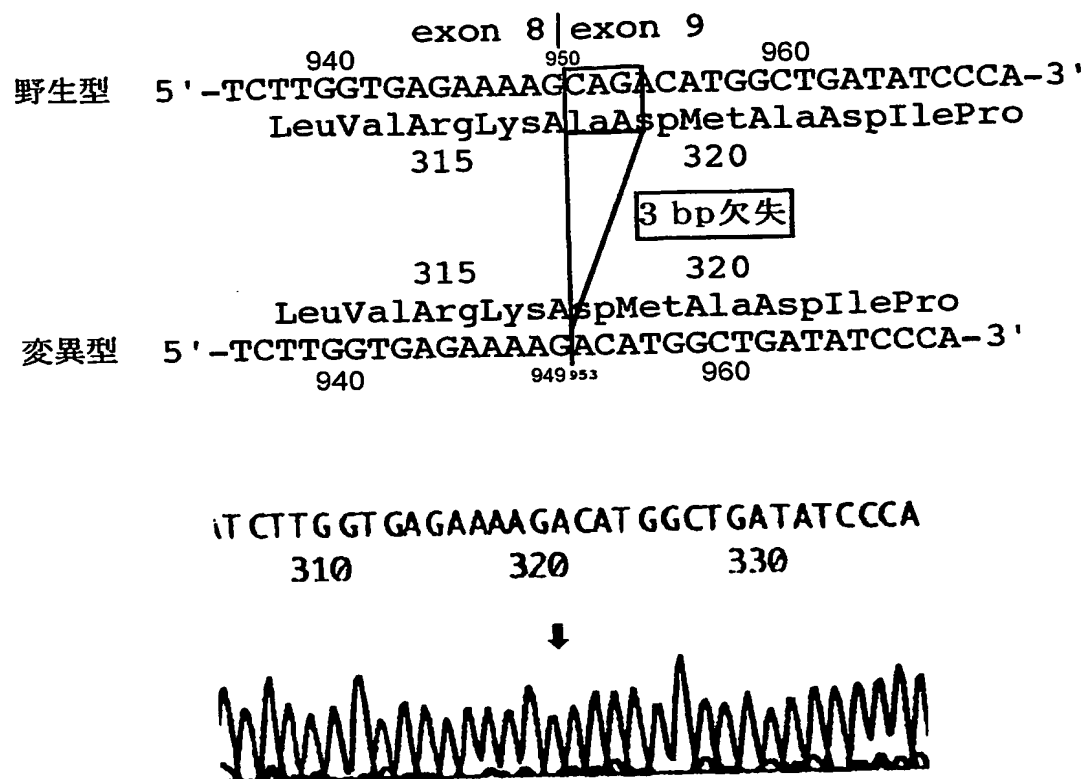
第 9 図

375                      378                      380  
 ProValGlyGlnAspGlyGlyLeuAlaThrCys  
                                  Arg  
                                  G  
 5' - CCTGTGGGCCAGGAC / GGGGCCTTGCCACCTGC - 3'  
                                  C  
 1120                      1130                      1140



【図10】

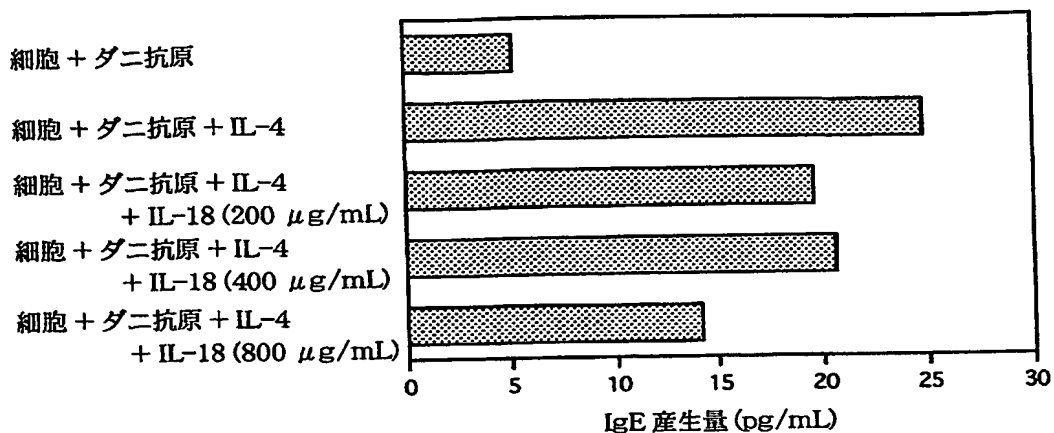
# 第 10 図



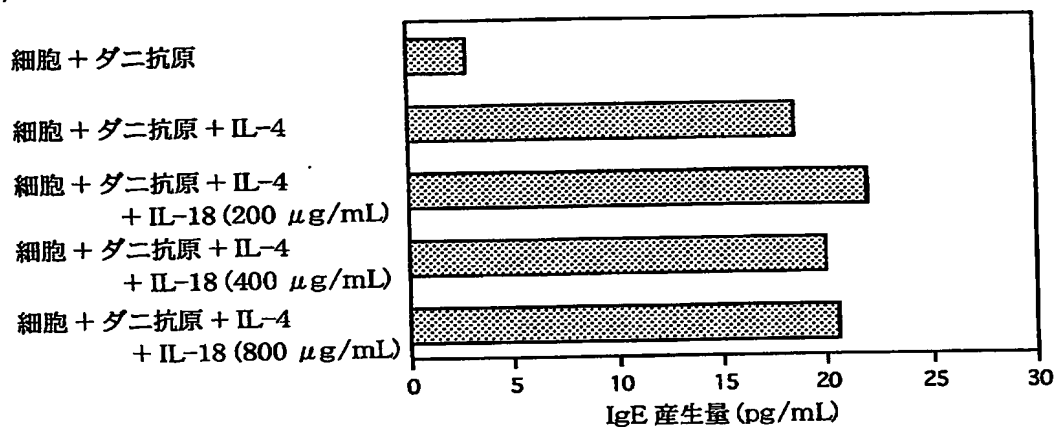
【図 11】

## 第 11 図

a) 非アレルギー者



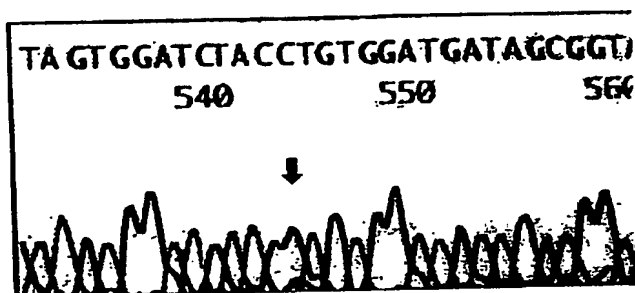
b) 950del13のアレルギー患者



【図 12】

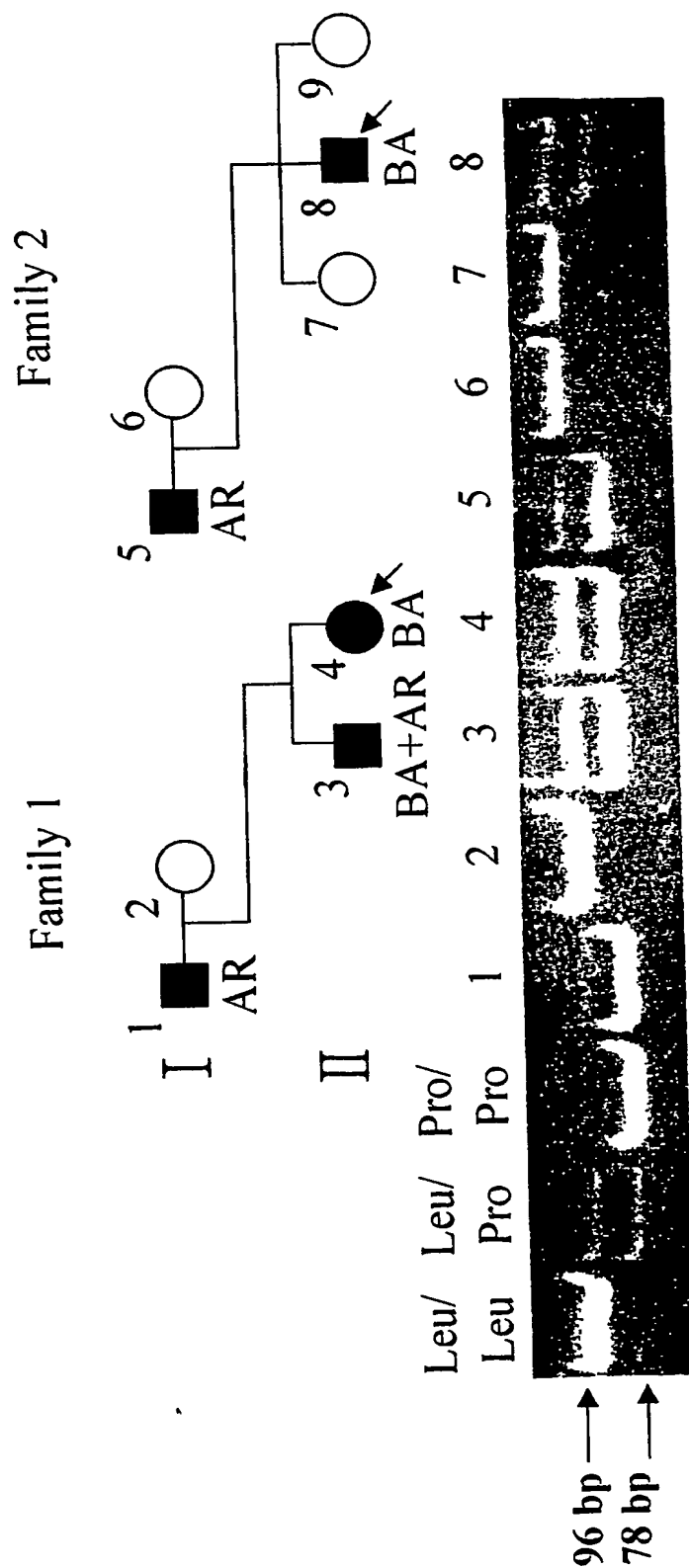
## 第 12 図

	1390	1400	1410
野生型	5' -CTAGTGGATCTACTTGTGGATGATAGCGGT-3'		
	LeuValAspLeuLeuValAspAspSerGly		
	465	467	470
	LeuValAspLeuProValAspAspSerGly		
変異型	5' -CTAGTGGATCTACCTGTGGATGATAGCGGT-3'		
	1390	1400	1410



【図 13】

# 第 13 図



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 IgEの産生に関連する遺伝子とアレルギーの素因とを関連づける要素を見い出して、これを利用した、アレルギーの素因の解析手段を提供することで、アレルギー性疾患の発症の予防や、アレルギー性疾患の治療に寄与する途を提供すること。

【解決手段】 アレルギーの素因に関連する遺伝子である、インターロイキン12レセプターIL-1 $\beta$ 2鎖および $\beta$ 1鎖遺伝子と、インターロイキン18レセプター $\alpha$ 鎖遺伝子と、インターフェロン $\gamma$ レセプター1鎖遺伝子における遺伝子変異を検出することで、アレルギーの素因を検出することが可能であり、この検出を行うことにより、上記の課題を解決し得ることを見い出した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 5 2 4 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 1 0 8 3 3 3 6 ]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 8 月 2 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 丁目 2 1 番 3 号

氏 名

株式会社ビー・エム・エル

特願 2 0 0 2 - 2 5 2 4 4 6

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 5 0 2 3 1 6 0 6 1 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県名古屋市瑞穂区上坂町 1 - 3 - 1

氏 名

近藤 直実